



MicroScan

Rapid Yeast ID Procedural Manual

REF B1017-70

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)	56
Lietuviškai (LT)	62
Magyar (HU)	68
Polski (PL)	75
한국어 (KO)	82
Türkçe (TR)	88
Русский (RU)	94
Български (BG)	101
Română (RO)	108
Србија (SR)	114
Português Brasil (PT-BR)	120
Nederlands (NL)	127
Tiếng Việt (VI)	134
REFERENCES	140

MicroScan

Rapid Yeast ID Procedural Manual

REF B1017-70

INTENDED USE

The Rapid Yeast Identification Panel is designed for rapid identification of yeast and yeast-like species isolated from clinical specimens.

SUMMARY AND PRINCIPLE

Chromogenic and modified conventional tests are used for the identification of yeast species isolated from clinical specimens. The Rapid Yeast Identification Panel is a 96 well microdilution panel that utilizes 27 dehydrated substrates (Refer to Table 1-1). A heavy suspension of the yeast in autoclaved water is used to rehydrate the substrates. An identification is obtained after incubation of the panel at 35-37°C for 4 hours.

WARNING AND PRECAUTIONS

1. Rapid Yeast Identification Panels are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Do not allow Peptidase or Sodium Hydroxide reagent 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 awareness that inoculated panels contain potentially pathogenic organisms.
4. All materials should be autoclaved prior to disposal.

STORAGE

Store panels and Peptidase reagent at 2-8°C.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Not classified as hazardous

SDS

Safety Data Sheet is available at techdocs.beckmancoulter.com

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Refer to the American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology¹ or other mycology reference manuals for recommended procedures for the transport and isolation of yeasts. Rapid chromogenic tests are based upon the presence of preformed enzymes in the unknown organism.^{2,3,4} Thus, the plating medium on which the organism is grown will influence the test results because of the induction of different enzymes by different media. The Rapid Yeast Identification Panel is based upon the use of Sabouraud Dextrose Agar (either standard or Emmons' modification). The presence of antibiotics in the growth medium is not a critical variable, however media containing blood, Yeast Extract-Malt Extract (YM) Agar and Inhibitory Mold Agar (IMA) should not be used.

MATERIALS PROVIDED

Rapid Yeast Identification Panels (B1017-70)

Worksheet

Procedural Manual

Quality Control Chart

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Inoculum Water (B1015-2)

0.05N Sodium Hydroxide (B1015-3)

Peptidase Reagent (B1012-30B)

Yeast Turbidity standard (B1015-18)

Cover Trays (B1010-56B)

MicroScan Yeast Biotype Codebook (B1014-1A)

Inoculating loops

Sabouraud Dextrose Agar plates

Vortex mixer

50 µL pipettor with tips

Incubator (35-37°C), non-CO₂

Quality control organisms:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDURE

Preparation of Panels

1. Remove the panels to be used from storage. **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. Inoculate the Rapid Yeast Identification Panel with an actively growing organism. Colonies from a primary isolation Sabouraud Dextrose Agar plate may be used if sufficient growth is present. If necessary, subculture the yeast isolate onto a Sabouraud Dextrose Agar plate and incubate until sufficient growth occurs. Incubation for 48 hours at 30°C or 48 to 72 hours at 25°C (room temperature) is recommended.

NOTE: Cultures incubated for more than 48 hours at 30°C should be used only if additional incubation is required to obtain adequate growth.

2. Using a sterile swab or inoculating loop, remove growth from the agar plate and emulsify in 3 mL of Inoculum Water (autoclaved deionized water in a 13 x 84 mm or 13 x 100 mm tube). Each suspension must be compared and be equivalent to the MicroScan Yeast Turbidity Standard. The comparison to the test inoculum suspension and the Yeast Turbidity Standard should be done using an adequate light source and by comparing the tubes to a white card with contrasting black lines.

NOTE: Take care to insure that no agar medium is removed with the organism.

3. Mix or vortex the suspension until it is homogeneous. Some yeast strains do not readily disperse in water. If vortexing does not result in a homogeneous suspension, let the suspension sit for 10-15 minutes and revortex. If the suspension still has clumps, allow the clumps to settle to the bottom of the tube and use the supernatant to inoculate the yeast panel. The turbidity of the supernatant must match the MicroScan Yeast Turbidity Standard. If it does not, transfer more growth to the Inoculum Water and repeat the above procedure.

NOTE: DO NOT pipette clumps of cells into the yeast panel.

Panel Inoculation

1. Label the panel with the specimen number.
2. Add 50 µL of yeast suspension to each substrate-containing well plus the control wells BNAC and NPC. Use of a Pasteur pipette for inoculation is not recommended.

Table 1-1, Substrates

Substrates	Abbr.	Substrates	Abbr.
Hydroxyproline-β-Naphthylamide	HPR	L-Histidine-β-Naphthylamide	HIS
L-Isoleucine-β-Naphthylamide	ILE	Sucrose	SUC1
L-Proline-β-Naphthylamide	PRO	Sucrose	SUC2 ¹
L-Tyrosine-β-Naphthylamide	TYR	Trehalose	TRE
Glycine β-Naphthylamide	GLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL1
Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL2 ¹
Glycyl-L-Arginine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	GLAR	p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranoside	BGL
Glycyl-L-Proline-4-Methoxy-β-Naphthylamide	GLPR	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	BGAL
L-Arginyl-L-Arginine-β-Naphthylamide	AARG	p-Nitrophenyl-β-D-Fucopyranoside	BDF
L-Lysyl-L-Alanine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	LYAL	p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranoside	AGAL
L-Alanine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	ALA	p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamine	NAG
L-Seryl-L-Tyrosine-β-Naphthylamide	STY	p-Nitrophenyl-β-D-Cellobiose	CELL
Urea	URE	p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Galactosaminide	NGAL
3-Indoxyl Phosphate	IDX		

1. Different formulations of the same Substrates are used.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

- After the panel has been inoculated with the 50 μ L inoculum, lightly tap each side of the panel to help ensure mixing with the substrate.

NOTE: If the panel is to be read on the WalkAway or autoSCAN-4 the LOC well must also be inoculated.

Incubation

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

Reading the Panels

- 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.
- Read the panels using reflected light from a white background.
- After 4 hours of incubation, add the Peptidase and Sodium Hydroxide (NaOH) reagents to the appropriate wells.

- Add **1 drop** of Peptidase reagent to the BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY and HIS wells. Allow the color to develop for 30 seconds before recording the results. Results must be recorded within 3 minutes of reagent addition. The presence of ANY shade of pink or red in the solution throughout the entire well or any portion of the well is interpreted as positive. Colors should be compared to the BNAC well. Some wells may appear a darker orange than the BNAC well. These should be recorded as negative. Reactions are positive only if there is pink or red present in the solution. The color in these wells will darken with time. A negative yellow color may become a darker orange color. This should be interpreted as a negative reaction.

NOTE: Following addition of Peptidase to the BNAC well, it should be yellow. If there is any pink or red present, the Peptidase reagent should not be used.

- Add **1 drop** of 0.05N NaOH to AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL and NGAL wells. Wait at least 5 seconds, but no longer than 5 minutes, before recording results. Any shade of yellow should be recorded as a positive. Compare the substrate-containing wells to the NPC well.

NOTE: These wells may appear darker than the NPC well. This should be interpreted as negative, but a yellow color must be present to be considered positive.

- Two control wells are provided to assist in interpreting the reactions.
 - BNAC = β -naphthylamide control. After addition of Peptidase reagent, this well will be yellow in color.
 - NPC = nitrophenyl control. This well should be colorless.
- Refer to the RESULTS section for aid in biochemical interpretation.

NOTE: The WalkAway reads wells that do not require reagents first to prevent altered results due to reagent fumes that may be trapped under the tray lid, therefore, biochemical reactions cannot be verified manually.

RESULTS

Substrate Interpretations

Well	Reagent	Positive	Negative
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Add 1 drop of Peptidase reagent. Allow color reaction to develop for at least 30 seconds, but no longer than 3 min.	Any shade of Pink, Red to Magenta in the solution ¹	Yellow to Orange
SUC1 SUC2 TRE		Any shade of Brown or Yellow	Purple
AGL1 BGL BGAL	Compare to the NPC control well.	Any shade of yellow ²	Clear
URE		Pink to Magenta	Clear/Beige to Yellow

Well	Reagent	Positive	Negative
IDX		Any shade of Blue	Clear
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Add 1 drop of 0.05 N NaOH. Wait at least 5 seconds, but no longer than 5 minutes before recording result. Compare to the NPC control well.	Any shade of Yellow ²	Clear

1. A positive color may not be present throughout the entire well.

2. A pink color may be present with some yeasts. This should be considered a positive reaction.

PRINCIPLES OF IDENTIFICATION REACTIONS

Amino acid β -naphthylamide substrates (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - When the substrate is hydrolyzed by the appropriate enzyme (usually an amino acid arylamidase), β -naphthylamine is released. The β -naphthylamine 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 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.

Carbohydrates (SUC1, SUC2, TRE) - The utilization of sucrose and trehalose results in a pH drop which causes the chlorophenol red to change from purple to yellow. These carbohydrate reactions are selective and may not conform to conventional reactions.

Nitrophenyl Substrates (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - If the appropriate enzyme is present, the substrate is cleaved releasing ortho- or para-nitrophenol. At alkaline pH, these compounds are yellow. If the reaction occurs at an acidic pH, NaOH must be added after incubation before the results can be read. The wells may be either colorless or pale yellow before the sodium hydroxide is added.

Indoxyl Phosphatase (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-gray precipitate.

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 phenol red changing from yellow to red.

ORGANISM IDENTIFICATION

The MicroScan Rapid Yeast Biotype Codebook is used for the identification of unknown test organisms. This codebook has been generated from MicroScan's data base for the tests included on the identification panel. The Yeast Codebook is based on a computer analysis of the 27 tests on the Rapid Yeast Identification Panel. The test results are transformed into a 9 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 total of 99.9%.

Should a biotype number occur that cannot be found in the codebook, one should first suspect a procedural error; for example, 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. Rapid Yeast Identification Panels are designed for identification of yeast and yeast-like organisms (e.g., *Prototheca*). Care must be taken with organisms with excessive hyphal production.
2. Should more than one species identification be listed for a particular biotype number, supplemental tests may be necessary. Accepted identification procedures of yeast and yeast-like organisms include colonial morphology, growth at elevated temperature, pigment formation and color on phenoloxidase agar. Microscopic morphology on media designed to elicit typical morphology can also aid in identification of these organisms. Refer to appropriate mycology reference procedures.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Variation in chromogenic results may occur due to excessive over or under inoculation of the system. Each inoculum must be compared to the turbidity standard to achieve the correct concentration of inoculum for optimum performance.

QUALITY CONTROL

The acceptability of the Identification substrates should be checked by testing organisms of known reactions. The results for each reaction for the recommended MicroScan control organisms are found in the Quality Control Chart located in this manual.

Quality Control Chart Rapid Yeast Identification Substrates

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Shaded QC specifications in the table above will be implemented in LabPro software versions ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. A positive result may be obtained with *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.
3. A negative result may be obtained with *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Instrument reads may require visual verification.
5. A positive result may be obtained with *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

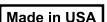
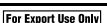
Note: Quality Control organisms are selected to provide positive/negative reactions for all identification substrates. As a result of this, the organism identification may vary from that stated in the QC chart. The acceptability of product performance should be determined by comparison of test results, not identification.

WARRANTY STATEMENT

The system is covered by and subject to the provisions of the warranty included in your contractual agreement for the system or its reagents. The customer is responsible for routine preventive maintenance procedures. Repairs arising from the failure to perform these maintenance procedures at the indicated time intervals are made at the discretion of Beckman Coulter, and at the customer's expense.

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
	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

Symbols Key			
Symbol	Symbol Title	Description of Standard	Standard
	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
	In Vitro 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 de l'identification rapide des levures

REF B1017-70

UTILISATION

La Plaque d'identification rapide des levures est conçue pour identifier rapidement les levures et espèces levuriformes isolées d'échantillons cliniques.

RÉSUMÉ ET PRINCIPE

On utilise des tests chromogéniques et des tests conventionnels modifiés pour identifier les espèces de levures isolées des échantillons cliniques. La plaque d'identification rapide des levures est une plaque de microdilution dotée de 96 puits, qui utilise 27 substrats déshydratés (Voir Tableau 1-1). Une suspension lourde de levure dans une eau autoclavée est utilisée pour réhydrater les substrats. On peut obtenir une identification après incubation de la plaque à 35–37 °C pendant 4 heures.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Les Plaques d'identification rapide des levures sont conçues pour un usage diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Ne pas laisser le réactif Peptidase ou le réactif d'hydroxyde de sodium, 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 que les plaques inoculées contiennent des organismes potentiellement pathogènes.
4. Tous les matériels doivent être stérilisés en autoclave avant la mise au rebut.

CONSERVATION

Conserver les plaques et le réactif Peptidase 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

Consulter le manuel de référence de l'American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology (Manuel de microbiologie clinique)¹ ou tout autre manuel de référence de mycologie pour les procédures recommandées pour le transport et l'isolation des levures. Les tests chromogéniques rapides se basent sur la présence d'enzymes pré-formées dans l'organisme inconnu.^{2,3,4}. Ainsi, le milieu de mise en culture sur lequel l'organisme se développe influencera les résultats du test, en raison de l'induction de différentes enzymes par différents milieux. La Plaque d'identification rapide des levures se base sur l'utilisation de la gélose Sabouraud Dextrose (standard ou à modification Emmons). La présence d'antibiotiques dans le milieu de croissance ne constitue pas une variable critique, toutefois, il convient de ne pas utiliser de milieu contenant du sang, d'extrait de levure ou de malt (YM) et de gélose à inhibition de moisissures (IMA).

MATÉRIEL FOURNI

Plaques d'identification rapide des levures (B1017-70)

Feuille de travail

Manuel d'utilisation

Graphique de contrôle de qualité

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Eau pour inoculum (B1015-2)

0,05N Hydroxyde de sodium Hydroxide (B1015-3)

Réactif Peptidase (B1012-30B)

Turbidité des levures standard (B1015-18)

Couvercles (B1010-56B)

Livre de code des biotypes de levures MicroScan (B1014-1A)

Anses d'inoculation

Plaques gélosées Sabouraud Dextrose

Agitateur vortex

Pipette de 50 µL avec embouts

Incubateur (35–37 °C), sans CO₂

Organismes de contrôle de qualité :

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCÉDURE

Préparation des plaques

1. Retirer les plaques à utiliser de la zone de stockage. **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. Inoculer la plaque d'identification rapide des levures avec un organisme à croissance active. Les colonies d'une plaque gélosée Sabouraud Dextrose à isolation primaire peuvent être utilisées si elles présentent une croissance suffisante. Si nécessaire, faire une sous-culture de l'isolat de levure sur une plaque gélosée Sabouraud Dextrose et incuber jusqu'à ce qu'une croissance suffisante se produise. Il est recommandé de procéder à une incubation pendant 48 heures à 30 °C ou de 48 à 72 heures à 25 °C (température ambiante).

REMARQUE : les cultures incubées plus de 48 heures à 30 °C ne doivent être utilisées que si une incubation supplémentaire est nécessaire à l'obtention de la croissance adéquate.

2. À l'aide d'un écouvillon stérile ou d'une anse d'inoculation, retirer la croissance de la plaque gélosée et mettre en suspension dans 3 mL d'eau pour inoculum (eau désionisée autoclavée dans un tube de 13 x 84 mm ou 13 x 100 mm). Chaque suspension doit être comparée et être équivalente à la turbidité standard de levure MicroScan. La comparaison de la suspension d'inoculum test et de la turbidité standard de levure doit être réalisée à l'aide d'une source lumineuse adaptée et en comparant les tubes à une carte blanche avec des lignes noires en contraste.

REMARQUE : veiller à ne retirer aucun milieu gélosé avec l'organisme.

3. Mélanger la suspension, ou la passer dans un vortex, jusqu'à obtention d'une consistance homogène. Certaines souches de levure ne se dispersent pas facilement dans l'eau. Si le passage au vortex ne produit pas de suspension homogène, laisser reposer la suspension 10–15 minutes avant de la repasser au vortex. Si la suspension présente toujours des masses visibles, les laisser reposer au fond du tube et utiliser le surnageant pour inoculer la plaque de levures. La turbidité du surnageant doit correspondre à la turbidité standard de levure MicroScan. Si ce n'est pas le cas, transférer davantage de croissance dans l'eau d'inoculum et renouveler la procédure ci-dessus.

REMARQUE : NE PAS transférer à la pipette des masses de cellules dans la plaque de levures.

Inoculation de plaque

1. Appliquer une étiquette avec le numéro d'échantillon sur la plaque.
2. Ajouter 50 µL de suspension de levure à chaque puits contenant du substrat, ainsi qu'aux puits de contrôle BNAC et NPC. Il est déconseillé d'utiliser une pipette Pasteur pour l'inoculation.

Tableau 1-1, Substrats

Substrats	Abr.	Substrats	Abr.
Hydroxyproline-β-Naphthylamide	HPR	L-Histidine-β-Naphthylamide	HIS
L-Isoleucine-β-Naphthylamide	ILE	Saccharose	SUC1
L-Proline-β-Naphthylamide	PRO	Saccharose	SUC2 ¹
L-Tyrosine-β-Naphthylamide	TYR	Tréhalose	TRE
Glycine β-Naphthylamide	GLY	p-Nitrophényl-α-D-Glucopyranoside	AGL1
Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY	p-Nitrophényl-α-D-Glucopyranoside	AGL2 ¹
Glycyl-L-Arginine-4-Méthoxy-β-Naphthylamide	GLAR	p-Nitrophényl-β-D-Glucopyranoside	BGL
Glycyl-L-Proline-4-Méthoxy-β-Naphthylamide	GLPR	o-Nitrophényl-β-D-Galactopyranoside	BGAL
L-Arginyl-L-Arginine-β-Naphthylamide	AARG	p-Nitrophényl-β-D-Fucopyranoside	BDF
L-Lysyl-L-Alanine-4-Méthoxy-β-Naphthylamide	LYAL	p-Nitrophényl-α-D-Galactopyranoside	AGAL
L-Alanine-4-Méthoxy-β-Naphthylamide	ALA	p-Nitrophényl-N-Acétyle-β-D-Glucosamine	NAG
L-Seryl-L-Tyrosine-β-Naphthylamide	STY	p-Nitrophényl-β-D-Cellobiose	CELL

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Substrats	Abr.	Substrats	Abr.
Urée	URE	p-Nitrophényl-N-Acétyle-β-D-Galactosaminide	NGAL
3-Indoxyl Phosphate	IDX		

1. On utilise différentes formules des mêmes substrats.

- 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.

REMARQUE : si la plaque doit être lue sur le WalkAway ou sur l'autoSCAN-4, le puits LOC doit également être inoculé.

Incubation

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

Lecture des plaques

- 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 re-dissolution du précipité cristallin, car des températures élevées entraînent la dégradation du réactif.
- Lire les plaques à l'aide de la lumière réfléchissante, sur fond blanc.
- Après 4 heures d'incubation, ajouter les réactifs de Peptidase et d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans les puits concernés.

- Ajouter **1 goutte** de réactif peptidase aux puits BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY et HIS. Laisser la couleur se développer 30 secondes avant d'enregistrer les résultats. Les résultats doivent être enregistrés sous 3 minutes après l'ajout du réactif. La présence de TOUTE teinte de rose ou de rouge dans la solution sur tout ou partie du puits est interprétée comme positive. Les couleurs doivent être comparées au puits BNAC. Certains puits peuvent apparaître d'une teinte orange plus foncée que le puits BNAC. Elles doivent être enregistrées comme négatives. Les réactions ne sont positives que si la solution présente du rose ou du rouge. Les couleurs de ces puits deviennent plus foncées avec le temps. Une couleur jaune négative peut devenir d'une teinte orange plus foncée. Cela doit être interprété comme une réaction négative.

REMARQUE : suite à l'ajout du Peptidase dans le puits BNAC, la couleur doit être jaune. En présence de rose ou de rouge, le réactif Peptidase ne doit pas être utilisé.

- Ajouter **1 goutte** de 0,05N NaOH aux puits AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL et NGAL. Attendre au moins 5 secondes, mais pas plus de 5 minutes, pour enregistrer les résultats. Toute teinte jaune doit être enregistrée comme un positif. Comparer les puits contenant du substrat au puits NPC.

REMARQUE : ces puits peuvent sembler plus foncés que les puits NPC. Cela doit être interprété comme négatif, mais une couleur jaune doit être présente pour déclarer un résultat positif.

- Deux puits de contrôle sont proposés pour aider à l'interprétation des réactions.
 - BNAC = contrôle β-naphthylamide. Après l'ajout du réactif Peptidase, ce puits doit présenter une couleur jaune.
 - NPC = contrôle nitrophényl. Ce puits doit être incolore.
- Se référer à la section RÉSULTATS pour avoir une aide sur l'interprétation biochimique.

REMARQUE : le WalkAway lit en premier les puits qui ne nécessitent pas de réactif pour éviter l'altération des résultats, puisque des émanations de réactif peuvent être coincées sous le couvercle du plateau ; par conséquent, il n'est pas possible de vérifier manuellement les réactions biochimiques.

RÉSULTATS

Interprétations du substrat

Well	Réactif	Positif	Négatif
HPR	Ajouter 1 goutte de réactif peptidase. Laisser la réaction de couleur se développer pendant au moins 30 secondes, mais pas plus de 3 minutes.	Teinte de rose, rouge ou magenta dans la solution ¹	Jaune à orange
ILE			
PRO			
TYR			
GLY			
GGLY			
GLAR			
GLPR			
AARG			
LYAL			
ALA			
STY			
HIS			

Well	Réactif	Positif	Négatif
SUC1 SUC2 TRE		Toute teinte de brun ou jaune	Violet
AGL1 BGL BGAL URE	Comparer au puits de contrôle NPC.	Toute teinte de jaune ²	Clair
IDX		Rose à magenta	Claire/beige à jaune
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Ajouter 1 goutte de 0,05 N NaOH. Attendre au moins 5 secondes, mais pas plus de 5 minutes, pour enregistrer le résultat. Comparer au puits de contrôle NPC.	Toute teinte de bleu	Clair
		Toute teinte de jaune ²	Clair

1. Il est possible que la couleur positive ne soit pas présente sur tout le puits.

2. Certaines levures peuvent présenter une couleur rose. Cela doit être considéré comme une réaction positive.

PRINCIPES DES RÉACTIONS D'IDENTIFICATION

Substrat d'acide aminé β -naphthylamide (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS)

- Une fois le substrat hydrolysé par l'enzyme adaptée (généralement un acide aminé arylamidase), de la β -naphthylamine est libérée. La β -naphthylamine est détectée 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.

Glucides (SUC1, SUC2, TRE) - L'utilisation de saccharose et de tréhalose entraîne une chute du pH, qui entraîne le passage du rouge chlorophénol du violet au jaune. Ces réactions de glucides sont sélectives et peuvent ne pas être conformes aux réactions conventionnelles.

Substrats de nitrophényl (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - Si l'enzyme souhaitée est présente, le substrat est fendu et dégage de l'ortho- ou du para-nitrophénol. À un pH alcalin, ces composants sont jaunes. Si une réaction se produit à un pH acide, le NaOH doit être ajouté après l'incubation la lecture des résultats. Les puits sont soit incolores soit jaune pâle avant l'ajout de l'hydroxyde de sodium.

Indoxyl Phosphatase (IDX) - L'Indoxyl phosphate est fendu par une phosphatase, et dégage alors de l'indoxyl. Ce dernier se combine à l'oxygène pour former un bleu indigo, qui est un précipité insoluble bleu ou bleu-gris.

Urée (URE) - L'urée est divisée par l'uréase, pour former de l'ammoniaque et du dioxyde de carbone. L'ammoniaque (sous forme de carbonate d'ammonium) entraîne une augmentation du pH, détectée par un changement du phénol rouge du jaune au rouge.

IDENTIFICATION DE L'ORGANISME

Le Livre de code des biotypes de levures rapides 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 MicroScan pour les tests inclus sur la plaque d'identification. Le livre de code des levures se base sur une analyse informatique des 27 tests de la plaque d'identification rapide des levures. Les résultats des tests sont transformés en un numéro de biotype à 9 chiffres, pour lesquels le livre de code énumère 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 biotype indisponible dans le livre de codes se produit, il convient d'abord d'envisager une erreur de procédure ; par exemple, le biotype a été incorrectement ajouté ou une réaction a été faussement enregistrée. Si le biotype est correct, la possibilité d'une culture mélangée doit être vérifiée et l'organisme doit être testé de nouveau, en insistant particulièrement sur l'utilisation d'une suspension de cellules suffisamment trouble. Si les résultats sont identiques après réitération du test des levures, consultez le Biotype Lookup Service sur le site internet de Beckman Coulter ou consultez votre revendeur local.

LIMITATIONS DE LA MÉTHODE

1. Les Plaques d'identification rapide des levures sont conçues pour l'identification des levures et des organismes levuriformes (par ex., *Prototheca*). Il convient d'être vigilant quant aux organismes à croissance hyphale excessive.
2. Si plusieurs identifications d'espèce sont indiquées pour un nombre de biotype particulier, des tests supplémentaires peuvent être nécessaires. Les procédures d'identification des levures et des organismes levuriformes comprennent la morphologie coloniale, la croissance à température élevée, la formation de pigment, et la couleur sur une gélose

phénoloxidase. La morphologie microscopique sur un milieu conçu pour provoquer une morphologie typique permet également de faciliter l'identification de ces organismes. Voir les procédures de référence de mycologie appropriées^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}.

3. Une inoculation excessive ou trop courte du système peut entraîner des variations des résultats chromogéniques. Chaque inoculum doit être comparé au standard de turbidité, pour obtenir la bonne concentration d'inoculum pour des performances optimales.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

La validité des substrats d'identification doit être contrôlée en testant des organismes ayant des réactions connues. Les résultats de chaque réaction pour les organismes de contrôle MicroScan recommandés sont présentés dans le Graphique de Contrôle de qualité du présent manuel.

Graphique de contrôle de qualité des substrats pour l'identification rapide des levures

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Les spécifications CQ grisées dans le tableau ci-dessus seront mises en œuvre dans les versions ≥ 1.90 du logiciel LabPro.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Il est possible d'obtenir un résultat positif avec *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.
3. Il est possible d'obtenir un résultat négatif avec *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. La lecture des instruments peut nécessiter une vérification visuelle.
5. Il est possible d'obtenir un résultat positif avec *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Remarque : les organismes de contrôle qualité sont sélectionnés de façon à donner des réactions positives/négatives pour tous les substrats d'identification. En conséquence, l'identification peut varier par rapport aux informations décrites dans le tableau de CQ. La validation des performances du produit sera déterminée par la comparaison des résultats pour les tests et non par l'identification.

GARANTIE

Le système est couvert par les clauses de la garantie incluse dans votre contrat concernant le système ou ses réactifs. Le client est responsable des procédures de maintenance préventive courantes. Les réparations dues à la non-exécution de ces procédures de maintenance aux intervalles spécifiés seront réalisées à la discrétion de Beckman Coulter et aux frais du client.

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
	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-Hefe-ID-Verfahrensanleitung

REF B1017-70

VERWENDUNGSZWECK

Das Rapid-Hefe-Identifikationspanel wurde zur schnellen Identifikation von Hefe und hefeartigen Spezies, die von klinischen Proben isoliert wurden, entwickelt.

ZUSAMMENFASSUNG UND PRINZIP

Chromogene und modifizierte konventionelle Tests werden für die Identifikation von Hefespezies, die von klinischen Proben isoliert wurden, entwickelt. Das Rapid-Hefe-Identifikationspanel ist ein Mikroverdünnungspanel mit 96 Vertiefungen, das 27 dehydrierte Substrate verwendet (siehe Tabelle 1-1). Eine schwere Suspension der Hefe in autoklaviertem Wasser wird verwendet, um die Substrate zu rehydrieren. Eine Identifikation wird nach der Inkubation des Panels bei 35–37 °C für 4 Stunden erhalten.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Rapid-Hefe-Identifikationspanels sind nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
2. Nicht zulassen, dass Peptidase- oder Natriumhydroxid-Reagenzien 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 Peptidase-Reagenz bei 2–8 °C lagern.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Nicht als gefährlich eingestuft



Das Sicherheitsdatenblatt ist auf techdocs.beckmancoulter.com verfügbar.

GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Siehe das Manual of Clinical Microbiology (Handbuch der klinischen Mikrobiologie) der American Society for Microbiology¹ oder andere Mykologie-Referenzhandbücher bezüglich empfohlener Verfahren für den Transport und die Isolation von Hefen. Chromogene Rapid-Tests basieren auf der Anwesenheit vorgeformter Enzyme in dem unbekannten Organismus.^{2,3,4} Somit beeinflusst das Plattierungsmedium, auf dem der Organismus wächst, die Testergebnisse aufgrund der Induktion von verschiedenen Enzymen durch verschiedene Medien. Das Rapid-Hefe-Identifikationspanel basiert auf dem Gebrauch von Sabouraud-Dextrose-Agar (entweder Standard oder der Modifikation von Emmons). Die Anwesenheit von Antibiotika in dem Wachstumsmedium ist keine kritische Variable, jedoch sollten Medien, die Blut, Hefe-Extrakt-Malz-Extrakt-(YM-)Agar und Inhibitory Mold Agar (IMA) enthalten, nicht verwendet werden.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Rapid-Hefe-Identifikationspanels (B1017-70)

Arbeitsblatt

Verfahrensanleitung

Qualitätskontrolltabelle

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Inokulumwasser (B1015-2)

0,05 N Natriumhydroxid (B1015-3)

Peptidase-Reagenz (B1012-30B)

Hefe-Trübungsstandard (B1015-18)

Abdeckplatten (B1010-56B)

MicroScan-Hefe-Biotyp-Codebuch (B1014-1A)

Impfösen

Sabouraud-Dextrose-Agarplatten

Vortexmischer

50 µL-Pipettierhilfe mit Spitzen
 Inkubator (35–37 °C), CO₂-frei
 Qualitätskontrollorganismen:
Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

VERFAHREN

Vorbereitung der Panels

1. Die zu verwendenden Panels aus dem Lager entnehmen. **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. Das Rapid-Hefe-Identifikationspanel mit einem aktiv wachsenden Organismus beimpfen. Kolonien von einer primär isolierten Sabouraud-Dextrose-Agarplatte können gegebenenfalls verwendet werden, wenn ausreichend Wachstum vorhanden ist. Falls notwendig, eine Subkultur des Hefeisolats auf einer Sabouraud-Dextrose-Agarplatte erstellen und inkubieren bis ausreichend Wachstum eingetreten ist. Eine Inkubation bei 30 °C für 48 Stunden oder bei 25 °C (Raumtemperatur) für 48 bis 72 Stunden wird empfohlen.

HINWEIS: Kulturen die länger als 48 Stunden bei 30 °C inkubiert wurden, sollten nur verwendet werden, wenn zusätzliche Inkubation erforderlich ist, um angemessenes Wachstum zu erreichen.

2. Das Wachstum mit einem sterilen Wattestäbchen oder einer Impföse von der Agarplatte entfernen und in 3 mL Inokulumwasser (autoklaviertes deionisiertes Wasser in einem 13-x-84-mm- oder 13-x-100-mm-Röhrchen) emulgieren. Jede Suspension muss mit dem MicroScan-Hefe-Trübungsstandard verglichen werden und äquivalent zu dem sein. Der Vergleich mit der Test-Inokulumsuspension und dem Hefe-Trübungsstandard sollte mit einer adäquaten Lichtquelle und durch Vergleichen der Röhrchen mit einer weißen Karte mit kontrastierenden schwarzen Linien durchgeführt werden.

HINWEIS: Darauf achten, sicherzustellen, dass kein Agarmedium mit dem Organismus entfernt wird.

3. Die Suspension mit oder ohne Vortex mischen, bis sie homogen ist. Einige Hefestämme verteilen sich nicht ohne Weiteres in Wasser. Wenn das Mischen mittels Vortex nicht zu einer homogenen Suspension führt, die Suspension für 10–15 Minuten stehen lassen und dann erneut mittels Vortex mischen. Wenn die Suspension immer noch Klumpen aufweist, zulassen, dass die Klumpen sich auf dem Boden des Röhrchens absetzen, und den Überstand verwenden, um das Hefepanel zu beimpfen. Die Trübung des Überstands muss dem MicroScan-Hefe-Trübungsstandard entsprechen. Wenn das nicht der Fall ist, mehr Wachstum zu dem Inokulumwasser übertragen und das obige Verfahren wiederholen.

HINWEIS: Zellklumpen NICHT in das Hefepanel pipettieren.

Inokulation des Panels

1. Das Panel mit der Probennummer etikettieren.
2. Zu jeder Substrat enthaltenden Vertiefung sowie den Kontrollvertiefungen, BNAC und NPC, 50 µL Hefesuspension hinzufügen. Der Gebrauch einer Pasteur-Pipette für die Inokulation wird nicht empfohlen.

Tabelle 1-1, Substrate

Substrate	Abk.	Substrate	Abk.
Hydroxyprolin-β-Naphthylamid	HPR	L-Histidin-β-Naphthylamid	HIS
L-Isoleucin-β-Naphthylamid	ILE	Saccharose	SUC1
L-Prolin-β-Naphthylamid	PRO	Saccharose	SUC2 ¹
L-Tyrosin-β-Naphthylamid	TYR	Trehalose	TRE
Glycin-β-Naphthylamid	GLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid	AGL1
Glycylglycin-β-Naphthylamid	GGLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid	AGL2 ¹
Glycyl-L-Arginin-4-Methoxy-β-Naphthylamid	GLAR	p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid	BGL
Glycyl-L-Prolin-4-Methoxy-β-Naphthylamid	GLPR	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid	BGAL

*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Substrate	Abk.	Substrate	Abk.
L-Arginyl-L-Arginin- β -Naphthylamid	AARG	p-Nitrophenyl- β -D-Fucopyranosid	BDF
L-Lysin-L-Alanin-4-Methoxy- β -Naphthylamid	LYAL	p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid	AGAL
L-Alanin-4-Methoxy- β -Naphthylamid	ALA	p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin	NAG
L-Seryl-L-Tyrosin- β -Naphthylamid	STY	p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiose	CELL
Harnstoff	URE	p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Galactosaminid	NGAL
3-Indoxylphosphat	IDX		

1. Unterschiedliche Formulierungen des gleichen Substrats werden verwendet.

3. Nachdem das Panel mit dem 50 μ L-Inokulum beimpft wurde, jede Seite des Panels leicht antippen, um die Mischung mit dem Substrat sicherzustellen.

HINWEIS: Wenn das Panel auf dem WalkAway oder autoSCAN-4 abgelesen werden soll, dann müssen die LOC-Vertiefungen ebenfalls beimpft werden.

Inkubation

1. Panels in Gruppen von 3 bis 5 mit einer Abdeckplatte 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 unter Verwendung von Licht ablesen, das von einem weißen Hintergrund reflektiert wurde.

3. Nach 4-stündiger Inkubation die Peptidase- und Natriumhydroxid(NaOH)-Reagenzien zu den entsprechenden Vertiefungen hinzufügen.

- A. **1 Tropfen** des Peptidase-Reagenz zu den Vertiefungen von BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY und HIS hinzufügen. Zulassen, dass die Farbe sich 30 Sekunden lang entwickelt, bevor die Ergebnisse abgelesen werden. Die Ergebnisse müssen innerhalb von 3 Minuten nach der Reagenzienhinzufügung abgelesen werden. Das Vorhandensein JEGLICHEN Rosa- oder Rottönen in der Lösung über die gesamte Vertiefung oder einen Teil der Vertiefung hinweg wird als positiv interpretiert. Farben sollten mit der BNAC-Vertiefung verglichen werden. Einige Vertiefungen erscheinen womöglich als ein dunkleres Orange als die BNAC-Vertiefung. Diese sollten als negativ gelesen werden. Reaktionen sind nur dann positiv, wenn Rosa oder Rot in der Lösung vorhanden sind. Die Farbe in diesen Vertiefungen wird sich mit der Zeit verdunkeln. Eine negative gelbe Farbe kann womöglich zu einer dunkleren orangen Farbe werden. Dies sollte als eine negative Reaktion interpretiert werden.

HINWEIS: Nach der Hinzufügung von Peptidase zu der BNAC-Vertiefung sollte diese gelb sein. Falls dort etwas Rosa oder Rot vorhanden sein sollten, darf das Peptidase-Reagenz nicht verwendet werden.

- B. **1 Tropfen** von 0,05 N NaOH zu den Vertiefungen AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL und NGAL hinzufügen. Mindestens 5 Sekunden, aber nicht länger als 5 Minuten warten, bevor Ergebnisse abgelesen werden. Jeder Gelbton ist als positiv zu interpretieren. Die Substrat enthaltenden Vertiefungen mit der NPC-Vertiefung vergleichen.

HINWEIS: Diese Vertiefungen erscheinen womöglich dunkler als die NPC-Vertiefung. Dies sollte als negativ interpretiert werden, aber eine gelbe Farbe muss vorhanden sein, um als positiv erachtet zu werden.

4. Zwei Kontrollvertiefungen werden mitgeliefert, um bei der Interpretation der Reaktionen zu helfen.

- A. BNAC = β -naphthylamide control (β -Naphthylamid-Kontrolle). Nach Hinzufügung des Peptidase-Reagenz wird diese Vertiefung gelb werden.

- B. NPC = nitrophenyl control (Nitrophenyl-Kontrolle). Diese Vertiefung sollte farblos sein.

5. Informationen zur Unterstützung bei der biochemischen Interpretation sind dem Abschnitt „ERGEBNISSE“ zu entnehmen.

HINWEIS: Das WalkAway liest Vertiefungen ab, die aufgrund von Dämpfen der Reagenzien, die möglicherweise unter dem Plattendeckel eingeschlossen sind, zunächst keine Reagenzien benötigen, um veränderte Ergebnisse zu vermeiden. Deshalb können biochemische Reaktionen nicht manuell verifiziert werden.

ERGEBNISSE

Substratinterpretationen

Well	Reagenz	Positiv	Negativ
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	1 Tropfen Peptidase-Reagenz hinzufügen. Zulassen, dass die Farbreaktion sich mindestens 30 Sekunden lang, aber nicht länger als 3 Minuten, entfaltet.	Jeglicher Ton von Rosa, Rot bis Purpurrot in der Lösung ¹	Gelb bis orangefarben
SUC1 SUC2 TRE		Jeder Braun- oder Gelbton	Purpur
AGL1 BGL BGAL	Mit der NPC-Kontrollvertiefung vergleichen.	Jeder Gelbton ²	Klar
URE		Rosa bis Purpurrot	Klar/Beige bis Gelb
IDX		Jeder Blauton	Klar
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	1 Tropfen von 0,05 N NaOH hinzufügen. Mindestens 5 Sekunden, aber nicht länger als 5 Minuten warten, bevor das Ergebnis abgelesen wird. Mit der NPC-Kontrollvertiefung vergleichen.	Jeder Gelbton ²	Klar

1. Eine positive Farbe wird möglicherweise nicht in der gesamten Vertiefung vorhanden sein.

2. Eine rosa Farbe ist möglicherweise bei einigen Hefen vorhanden. Dies sollte als eine positive Reaktion angesehen werden.

GRUNDLAGEN DER IDENTIFIKATIONSREAKTIONEN

Aminosäure-β-Naphthylamid-Substrate (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Wenn das Substrat durch das entsprechende Enzym (üblicherweise eine Aminosäure-Arylamidase) hydrolysiert ist, wird β-Naphthylamin freigegeben. Das β-Naphthylamin 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.

Kohlenhydrate (SUC1, SUC2, TRE) – Die Verwendung von Saccharose und Trehalose führt zu einem pH-Abfall, wodurch sich das Chlorophenolrot von Violett zu Gelb verändert. Diese Kohlenhydratreaktionen sind selektiv und entsprechen möglicherweise nicht konventionellen Reaktionen.

Nitrophenyl-Substrate (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Wenn das entsprechende Enzym vorhanden ist, wird das Substrat gespalten und gibt ortho- oder para-Nitrophenol frei. Bei alkalischem pH sind diese Verbindungen gelb. Wenn die Reaktion bei einem sauren pH eintritt, muss NaOH nach der Inkubation hinzugefügt werden, bevor die Ergebnisse abgelesen werden können. Die Vertiefungen können entweder farblos oder hellgelb sein, bevor das Natriumhydroxid hinzugefügt wird.

Indoxylphosphatase (IDX) – Indoxylphosphat wird durch eine Phosphatase gespalten, um Indoxyl freizugeben. Das Indoxyl verbindet sich mit Sauerstoff, um Indigoblau zu bilden, welches ein unlösliches Blau oder eine blaugraue Ausfällung ist.

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 Phenolrot erkannt wird, welches sich von Gelb zu Rot ändert.

ORGANISMUSIDENTIFIKATION

Das MicroScan-Rapid-Hefe-Biotyp-Codebuch wird für die Identifikation unbekannter Testorganismen verwendet. Dieses Codebuch wurde durch die Datenbank von MicroScan für die Tests erstellt, die in dem Identifikationspanel enthalten sind. Das Hefe-Codebuch basiert auf einer Computeranalyse der 27 Tests des Rapid-Hefe-Identifikationspanels. Die

Testergebnisse werden in eine 9-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.

Sollte eine Biotypnummer auftreten, die nicht in dem Codebuch gefunden werden kann, sollte zuerst ein Verfahrensfehler vermutet werden, beispielsweise dass die Biotypnummer falsch hinzugefügt oder eine Reaktion falsch abgelesen wurde. 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. Die Rapid-Hefe-Identifikationspanels wurden für die Identifikation von Hefe und hefeartigen Organismen (z. B. *Prototheca*) entwickelt. Bei Organismen mit übermäßiger Hyphenproduktion muss vorsichtig umgegangen werden.
2. Sollte mehr als eine Speziesidentifikation für eine bestimmte Biotypnummer aufgelistet werden, sind möglicherweise Zusatztests erforderlich. Akzeptierte Identifikationsverfahren von Hefe und hefeartigen Organismen umfassen koloniale Morphologie, Wachstum bei erhöhten Temperaturen, Pigmentbildung und Farbe auf Phenoloxidase-Agar. Mikroskopische Morphologie auf Medien, die entwickelt wurden, um eine typische Morphologie auszulösen, kann ebenfalls bei der Identifikation dieser Organismen helfen. Siehe die entsprechenden Mykologie-Referenzverfahren.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Variationen bei den chromogenen Ergebnissen können aufgrund extrem übermäßiger oder minimalistischer Inokulation des Systems auftreten. Jedes Inokulum muss mit dem Trübungsstandard verglichen werden, um die korrekte Konzentration von Inokulum für die optimale Leistung zu erreichen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Eignung der Identifikationssubstrate sollte durch die Testung von Organismen bekannten Reaktionsverhaltens überprüft werden. Die Ergebnisse für jede Reaktion der empfohlenen MicroScan-Kontrollorganismen können in der Qualitätskontrolltabelle in diesem Handbuch gefunden werden.

Qualitätskontrolltabelle für Rapid-Hefe-Identifikationssubstrate

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Die in der vorstehenden Tabelle farbig unterlegten QK-Spezifikationen werden in LabPro-Softwareversionen ≥ 1.90 implementiert.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
2. Ein positives Ergebnis kann mit *Rhodotulura rubra*, ATCC 66034 erzielt werden.
3. Ein negatives Ergebnis kann mit *Candida lusitanae*, ATCC 66035 erzielt werden.
4. Die Instrumentenablesungen erfordern womöglich eine visuelle Bestätigung.
5. Ein positives Ergebnis kann mit *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036 erzielt werden.

Hinweis: Die Organismen zur Qualitätskontrolle sind so ausgewählt, dass sie positive/negative Reaktionen für alle Identifikationssubstrate ergeben. Daraus ergibt sich, dass die Organismusidentifikation von jener abweichen kann, die in der Qualitätskontrolltabelle angegeben ist. Die einwandfreie Produktleistung sollte durch den Vergleich der Testergebnisse, nicht der Identifikation, ermittelt werden.

GARANTIE

Das System unterliegt den in Ihrer Vertragsvereinbarung für das System bzw. die dazugehörigen Reagenzien enthaltenen Garantiebestimmungen. Der Kunde ist für die Durchführung routinemäßiger vorbeugender Wartungsarbeiten verantwortlich. Reparaturen, die aufgrund nicht in den vorgegebenen Zeitabständen erfolgter Wartungsmaßnahmen entstehen, werden nach dem Ermessen von Beckman Coulter durchgeführt und dem Kunden in Rechnung gestellt.

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.
	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.

Liste der Symbole			
Symbol	Symbolbezeichnung	Beschreibung der Norm	Standard
	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 per lieviti

REF B1017-70

USO PREVISTO

Il pannello rapido di identificazione dei lieviti consente l'identificazione rapida di lieviti e specie lievitoformi isolati dai campioni clinici.

RIEPILOGO E PRINCIPIO

Per l'identificazione delle specie di lieviti isolate dai campioni clinici si utilizzano test cromogenici e convenzionali modificati. Il pannello rapido di identificazione dei lieviti è un pannello in microdiluizione a 96 pozzetti che impiega 27 substrati disidratati (fare riferimento alla Tabella 1-1). La reidratazione dei substrati si realizza mediante massiccia sospensione del lievito in acqua sterilizzata in autoclave. L'identificazione si ottiene dopo l'incubazione del pannello a 35–37 °C per 4 ore.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. I pannelli rapidi di identificazione dei lieviti sono solo per uso diagnostico *in vitro*.
2. Evitare il contatto del reagente idrossido di sodio o peptidasi o dei substrati di identificazione con gli occhi, la pelle o gli indumenti.
3. Durante l'esecuzione di tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e attenersi alle precauzioni previste contro i rischi microbiologici, ricordando che i pannelli inoculati contengono organismi potenzialmente patogeni.
4. Tutti i materiali devono essere sterilizzati in autoclave prima di essere eliminati.

CONSERVAZIONE

Conservare i pannelli e il reagente peptidasi a 2–8 °C.

CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Classificato non pericoloso

SDS

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

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per le procedure di trasporto e isolamento dei lieviti consigliate, consultare il Manual of Clinical Microbiology (Manuale di microbiologia clinica) dell'American Society for Microbiology¹ o altri manuali di micologia di riferimento. I test cromogenici rapidi si basano sulla presenza di enzimi preformati nell'organismo ignoto.^{2,3,4} Di conseguenza, il terreno su piastra utilizzato per la crescita dell'organismo influenza i risultati del test a causa dell'induzione di enzimi diversi da parte di terreni diversi. Il pannello rapido di identificazione dei lieviti si basa sull'utilizzo di agar destrosio Sabouraud (standard o con modifica Emmons). La presenza di antibiotici nel terreno di crescita non rappresenta una variabile critica, tuttavia non va utilizzato terreno contenente sangue, agar estratto di lievito-estratto di malto (YM) e agar inibitore di muffe (IMA).

MATERIALI FORNITI

Pannelli rapidi di identificazione dei lieviti (B1017-70)

Foglio di lavoro

Manuale delle procedure

Grafico del controllo di qualità

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Acqua per inoculo (B1015-2)

Idrossido di sodio 0,05 N (B1015-3)

Reagente peptidasi (B1012-30B)

Standard di torbidità dei lieviti (B1015-18)

Coperchi (B1010-56B)

Elenco dei codici dei biotipi di lieviti MicroScan (B1014-1A)

Anse per inoculo

Piastre di agar destrosio Sabouraud

Miscelatore vortex

Pipettatrice da 50 µL con punte

Incubatore (35–37 °C), non a CO₂

Organismi del controllo di qualità:

C29879–AB

Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDURA

Preparazione dei pannelli

1. Estrarre dalla confezione i pannelli da utilizzare. **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. Inoculare il pannello rapido di identificazione dei lieviti con un organismo in crescita attiva. In presenza di una crescita sufficiente, è possibile utilizzare le colonie di una piastra di agar destrosio Sabouraud di isolamento primario. Se necessario, subcolturare l'isolato di lievito su una piastra di agar destrosio Sabouraud e incubare finché la crescita non è sufficiente. Si consiglia l'incubazione per 48 ore a 30 °C o da 48 a 72 ore a 25 °C (temperatura ambiente).

NOTA: le colture incubate per più di 48 ore a 30 °C devono essere utilizzate soltanto se è necessaria un'ulteriore incubazione per ottenere una crescita adeguata.

2. Con un bastoncino o un'ansa per inoculo sterile, rimuovere la crescita dalla piastra di agar ed emulsionare in 3 mL di acqua per inoculo (acqua deionizzata sterilizzata in autoclave in provetta da 13 x 84 mm o 13 x 100 mm). Ogni sospensione deve essere confrontata e risultare equivalente allo standard di torbidità dei lieviti MicroScan. Il confronto con la sospensione dell'inoculo di test e lo standard di torbidità dei lieviti deve essere effettuato utilizzando una fonte luminosa adeguata e comparando le provette con una scheda bianca con righe nere a contrasto.

NOTA: aver cura di non rimuovere alcuna parte del terreno di coltura a base di agar insieme all'organismo.

3. Miscelare o vortexare la sospensione finché non risulta omogenea. Alcuni ceppi di lieviti non si disperdono immediatamente nell'acqua. Se dopo la miscelazione, la sospensione non risulta omogenea, lasciarla riposare per 10–15 minuti e vortexare di nuovo. Se la sospensione presenta ancora degli accumuli, attendere che questi si depositino sul fondo della provetta e utilizzare il surnatante per inoculare il pannello per lieviti. La torbidità del surnatante deve corrispondere allo standard di torbidità dei lieviti MicroScan. Se così non fosse, trasferire altra crescita nell'acqua per inoculo e ripetere la procedura descritta.

NOTA: NON pipettare agglomerati di cellule nel pannello per lieviti.

Inoculo del pannello

1. Etichettare il pannello con il numero di campione.
2. Aggiungere 50 µL di sospensione di lievito in ciascun pozzetto contenente substrato e nei pozzetti di controllo BNAC ed NPC. Si sconsiglia l'uso di una pipetta Pasteur per l'inoculo.

Tabella 1-1, Substrati

Substrati	Abbr.	Substrati	Abbr.
Idrossiprolina-β-naftilamide	HPR	L-istidina-β-naftilamide	HIS
L-isoleucina-β-naftilamide	ILE	Saccarosio	SUC1
L-prolina-β-naftilamide	PRO	Saccarosio	SUC2 ¹
L-tirosina-β-naftilamide	TYR	Trealosio	TRE
Glicina β-naftilamide	GLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranoside	AGL1
Glicilglicina-β-naftilamide	GGLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranoside	AGL2 ¹
Glicil-L-arginina-4-metossi-β-naftilamide	GLAR	p-nitrofenil-β-D-glucopiranoside	BGL
Glicil-L-prolina-4-metossi-β-naftilamide	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	BGAL
L-arginil-L-arginina-β-naftilamide	AARG	p-nitrofenil-β-D-fucopiranoside	BDF
L-lisil-L-alanina-4-metossi-β-naftilamide	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galattopiranoside	AGAL
L-alanina-4-metossi-β-naftilamide	ALA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosammina	NAG
L-seril-L-tirosina-β-naftilamide	STY	p-nitrofenil-β-D-cellobiosio	CELL
Urea	URE	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galattosaminide	NGAL
Fosfato 3-indossile	IDX		

1. Si utilizzano diverse formulazioni degli stessi substrati.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

3. Dopo aver inoculato il pannello con l'inoculo di 50 µL, picchiettare lievemente tutti i lati del pannello per favorire la miscelazione con il substrato.

NOTA: se la lettura del pannello verrà eseguita sul sistema WalkAway o autoSCAN-4, anche il pozzetto LOC deve essere inoculato.

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. Leggere i pannelli utilizzando luce riflessa da uno sfondo bianco.
3. Dopo 4 ore di incubazione, aggiungere i reagenti peptidasi e idrossido di sodio (NaOH) nei pozzetti appropriati.

- A. Aggiungere **1 goccia** di reagente peptidasi ai pozzetti BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS. Attendere per 30 secondi lo sviluppo del colore prima di registrare i risultati. I risultati devono essere registrati entro 3 minuti dall'aggiunta del reagente. La presenza di QUALSIASI sfumatura di rosa o rosso nella soluzione, nell'intero pozzetto o in una sua parte, va interpretata come un risultato positivo. I colori devono essere confrontati con il pozzetto BNAC. Alcuni pozzetti possono avere una colorazione arancione più scura rispetto al pozzetto BNAC. In questo caso, il risultato deve essere registrato come negativo. Le reazioni sono positive solo in presenza di colore rosa o rosso nella soluzione. Il colore di questi pozzetti si scurisce nel tempo. Un colore giallo negativo può diventare arancione scuro. Questa reazione deve essere interpretata come negativa.

NOTA: dopo l'aggiunta della peptidasi al pozzetto BNAC, dovrebbe apparire una colorazione gialla. In presenza di colorazione rosa o rossa, non usare il reagente peptidasi.

- B. Aggiungere **1 goccia** di NaOH 0,05 N nei pozzetti AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL ed NGAL. Attendere almeno 5 secondi e non più di 5 minuti prima di registrare i risultati. Tutte le sfumature di giallo devono essere registrate come positive. Confrontare i pozzetti contenenti il substrato con il pozzetto NPC.

NOTA: questi pozzetti possono essere più scuri del pozzetto NPC. Questo risultato deve essere interpretato come negativo; per essere considerato positivo, deve presentare una colorazione gialla.

4. Sono forniti due pozzetti di controllo per agevolare l'interpretazione delle reazioni.
 - A. BNAC = controllo β-naftilamide. Dopo l'aggiunta del reagente peptidasi, questo pozzetto diventa giallo.
 - B. NPC = controllo nitrofenil. Questo pozzetto dovrebbe essere incolore.
5. Per ulteriori informazioni sull'interpretazione biochimica, consultare la sezione Risultati.

NOTA: il sistema WalkAway legge pozzetti che non richiedono di aggiungere prima i reagenti per evitare risultati alterati causati da eventuali fumi dei reagenti intrappolati sotto il coperchio, pertanto le reazioni biochimiche non possono essere verificate manualmente.

RISULTATI

Interpretazioni dei substrati

Well	Reagente	Positivo	Negativo
HPR	Aggiungere 1 goccia di reagente peptidasi. Attendere lo sviluppo della reazione cromatica per almeno 30 secondi e non più di 3 minuti.	Tutte le sfumature di rosa e da rosso a magenta nella soluzione ¹	Da giallo ad arancione
ILE			
PRO			
TYR			
GLY			
GGLY			
GLAR			
GLPR			
AARG			
LYAL			
ALA			
STY			
HIS			
SUC1		Tutte le sfumature di marrone o giallo	Porpora
SUC2			
TRE			

Well	Reagente	Positivo	Negativo
AGL1 BGL BGAL	Confrontare col pozzetto di controllo NPC.	Tutte le sfumature di giallo ²	Chiaro
URE		Dal rosa al magenta	Da trasparente/beige a giallo
IDX		Tutte le sfumature di blu	Chiaro
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Aggiungere 1 goccia di NaOH 0,05 N. Attendere almeno 5 secondi e non più di 5 minuti prima di registrare il risultato. Confrontare col pozzetto di controllo NPC.	Tutte le sfumature di giallo ²	Chiaro

1. La colorazione positiva può non essere presente nell'intero pozzetto.

2. Alcuni lieviti possono presentare una colorazione rosa. Questa deve essere considerata una reazione positiva.

PRINCIPI DELLE REAZIONI DI IDENTIFICAZIONE

Substrati di aminoacido-β-naftilamide (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS)

– Quando il substrato è idrolizzato con l'enzima adeguato (di norma, un'aminoacido-arilamidasi), si assiste al rilascio di β-naftilamina. La β-naftilamina viene rilevata mediante l'aggiunta di p-dimetilaminocinnamaldeide (nel reagente peptidasi), che crea un complesso dal colore che varia dal rosa al viola.

NOTA: l'enzima che scinde un'aminoacido-β-naftilamide è un'aminoacido-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'aminoacido N-terminale da un peptide). Un'arilamidasi e un'aminopeptidasi possono idrolizzare lo stesso substrato di aminoacido-β-naftilamide. Il pannello, pertanto, non misura necessariamente enzimi diversi e unici. Una sola arilamidasi può idrolizzare più aminoacido-β-naftilamidi.

Carboidrati (SUC1, SUC2, TRE) – L'utilizzo di saccarosio e trealosio comporta una riduzione del pH, che causa a propria volta la variazione della colorazione del rosso clorofenolo da viola a gialla. Queste reazioni ai carboidrati sono selettive e possono non coincidere con quelle convenzionali.

Substrati di nitrofenil (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Se è presente l'enzima appropriato, il substrato viene scisso liberando orto- o para-nitrofenolo. Con pH alcalino, questi composti sono gialli. Se la reazione avviene con pH acido, per poter leggere i risultati è necessario aggiungere NaOH dopo l'incubazione. I pozzetti possono essere incolori o color giallo pallido prima dell'aggiunta dell'idrossido di sodio.

Fosfatasi 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 grigio-blu.

Urea (URE) – L'ureasi idrolizza l'urea in modo da formare ammoniaca e anidride carbonica. L'ammoniaca (sotto forma di carbonato di ammonio) causa un innalzamento del pH rilevato dal rosso fenolo, che passa da giallo a rosso.

IDENTIFICAZIONE DELL'ORGANISMO

Per identificare gli organismi di test ignoti, si utilizza l'elenco dei codici dei biotipi di lieviti MicroScan. Questo elenco è stato generato dal database di MicroScan per i test inclusi nel pannello di identificazione. L'elenco dei codici dei lieviti si basa su un'analisi computerizzata dei 27 test del pannello rapido di identificazione dei lieviti. I risultati dei test vengono convertiti in un numero di biotipo di 9 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 totale 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; ad esempio, 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. I pannelli rapidi di identificazione dei lieviti consentono l'identificazione dei lieviti e degli organismi lievitoformi (ad es., *Prototheca*). Prestare attenzione in caso di organismi con eccessiva produzione di ife.
2. In caso di identificazione di più di una specie per un particolare numero di biotipo, potranno essere necessari dei test supplementari. Le procedure accettate per l'identificazione di lieviti e organismi lievitoformi includono morfologia delle colonie, crescita ad alta temperatura, formazione di pigmento e colore su agar fenolo-ossidasi. Inoltre, può essere utile per l'identificazione di questi organismi anche la morfologia microscopica su terreni pensati per ottenere una morfologia tipica. Consultare le procedure micologiche di riferimento appropriate.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}

3. L'inoculo eccessivo o insufficiente del sistema può comportare una variazione dei risultati cromogenici. Ogni inoculo deve essere confrontato con lo standard di torbidità per ottenere la concentrazione corretta, necessaria per prestazioni ottimali.

CONTROLLO DI QUALITÀ

L'accettabilità dei substrati di identificazione deve essere controllata testando organismi con reazioni note. I risultati di ciascuna reazione per gli organismi di controllo MicroScan raccomandati sono riportati nel grafico del controllo di qualità all'interno del presente manuale.

Substrati di identificazione rapida dei lieviti del grafico del controllo di qualità

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Le specifiche del controllo di qualità ombreggiate nella tabella precedente saranno implementate nelle versioni del software LabPro ≥ 1.90.

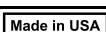
1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Si può ottenere un risultato positivo con *Rhodotulula rubra*, ATCC 66034.
3. Si può ottenere un risultato negativo con *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Le letture strumentali possono richiedere la verifica visiva.
5. Si può ottenere un risultato positivo con *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Nota: gli organismi del controllo di qualità vengono selezionati per ottenere reazioni positive/negative da tutti i substrati di identificazione. Di conseguenza, le identificazioni degli organismi potrebbero risultare diverse da quelle indicate nel grafico del controllo di qualità. L'accettabilità delle prestazioni del prodotto deve essere stabilita confrontando i risultati del test, non l'identificazione.

DICHIARAZIONE DI GARANZIA

Il sistema è coperto da garanzia e soggetto alle relative disposizioni contenute nell'accordo contrattuale per il sistema o i relativi reagenti. Il cliente è responsabile delle procedure di manutenzione preventiva di routine. Gli interventi di riparazione derivanti dalla mancata esecuzione di tali procedure agli intervalli di manutenzione indicati vengono effettuati a discrezione di Beckman Coulter e sono a carico del cliente.

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
	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 levaduras

REF B1017-70

INDICACIONES

El panel rápido de identificación de levaduras está diseñado para la identificación rápida de levaduras y de especies semejantes a las levaduras aisladas de muestras clínicas.

RESUMEN Y PRINCIPIOS

Se utilizan pruebas convencionales modificadas y cromogénicas para la identificación de especies de levaduras aisladas de muestras clínicas. El panel rápido de identificación de levaduras es un panel de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados (consulte la Tabla 1-1). Se utiliza una suspensión elevada de levadura en agua esterilizada en autoclave para rehidratar los sustratos. Se obtiene una identificación tras la incubación del panel a 35-37 °C durante 4 horas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Los paneles rápidos de identificación de levaduras son exclusivamente para uso *in vitro*.
2. No permita que el reactivo de peptidasa o de hidróxido de sodio 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 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 el reactivo de peptidasa a 2-8 °C.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

No clasificado como tóxico



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

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Consulte el Manual of Clinical Microbiology (Manual de Microbiología Clínica)¹ de la American Society for Microbiology u otros manuales de referencia de micología para conocer los procedimientos recomendados para el transporte y el aislamiento de levaduras. Las pruebas cromogénicas rápidas se basan en la presencia de enzimas preformadas en el microorganismo desconocido.^{2,3,4} Por lo tanto, el medio de placas en el que se cultiva el microorganismo influirá en los resultados de las pruebas debido a la inducción de diferentes enzimas por diferentes medios. El panel rápido de identificación de levaduras se basa en el uso de agar Sabouraud dextrosa (estándar o modificación de Emmons). La presencia de antibióticos en el medio de crecimiento no es una variable crítica; sin embargo, no deben utilizarse medios que contienen sangre, agar extracto de levadura y extracto de malta (YM) y agar inhibitorio de hongos (IMA).

MATERIALES PROPORCIONADOS

Paneles rápidos de identificación de levaduras (B1017-70)

Hoja de trabajo

Manual de procedimiento

Gráfico de control de calidad

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

Agua para inóculo (B1015-2)

Hidróxido de sodio de 0,05 N (B1015-3)

Reactivo de peptidasa (B1012-30B)

Estándar de turbidez de levaduras (B1015-18)

Paneles cubridores (B1010-56B)

Libro de códigos de los biotipos de levaduras MicroScan (B1014-1A)

Asas de inoculación

Placas de agar Sabouraud dextrosa

Mezclador de tipo vortex

Pipeta de 50 µL con puntas
 Incubador (35-37 °C), sin CO₂
 Microorganismos para control de calidad:
Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDIMIENTO

Preparación de paneles

1. Extraiga los paneles que se vayan a utilizar del lugar en el que se conservan. **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. Inocule el panel rápido de identificación de levaduras con un microorganismo de crecimiento activo. Pueden usarse colonias de una placa de agar Sabouraud dextrosa de aislamiento primario si hay presente un crecimiento suficiente. Si es necesario, realice un subcultivo de aislado de levadura en una placa de agar Sabouraud dextrosa e incube hasta que se produzca un crecimiento suficiente. Se recomienda realizar la incubación durante 48 horas a 30 °C o entre 48 y 72 horas a 25 °C (temperatura ambiente).

NOTA: Los cultivos incubados durante más de 48 horas a 30 °C se deben usar solamente si se requiere incubación adicional para obtener un crecimiento adecuado.

2. Con un hisopo estéril o un asa de inoculación, retire el crecimiento de la placa de agar y emulsione en 3 mL de agua para inóculo (agua desionizada esterilizada en autoclave en un tubo de 13 × 84 mm o 13 × 100 mm). Se debe comparar cada suspensión y debe ser equivalente al estándar de turbidez de levaduras MicroScan. La comparación de la suspensión de inóculo de prueba y el estándar de turbidez de levaduras se debe realizar empleando una fuente de luz adecuada y mediante una comparación de los tubos con una tarjeta blanca con líneas negras de contraste.

NOTA: Asegúrese de que no se retira medio agar con el microorganismo.

3. Mezcle o agite en vórtex la suspensión hasta que sea homogénea. Algunas cepas de levadura no se dispersan con facilidad en agua. Si después de agitar en vórtex no queda una suspensión homogénea, deje reposar la suspensión durante 10-15 minutos y vuelva a agitarla. Si la suspensión todavía tiene acumulaciones, permita que se asienten en el fondo del tubo y use el sobrenadante para inocular el panel de levaduras. La turbidez del sobrenadante debe coincidir con el estándar de turbidez de levaduras MicroScan. Si no lo hace, transfiera más crecimiento al agua para inóculo y repita el procedimiento anterior.

NOTA: NO pipetee acumulaciones de células en el panel de levaduras.

Inoculación del panel

1. Etiquete el panel con el número de muestra.
2. Añada 50 µL de suspensión de levadura a cada pocillo que contiene sustrato, más los pocillos de control de BNAC y NPC. No se recomienda el uso de una pipeta Pasteur para la inoculación.

Tabla 1-1, Sustratos

Sustratos	Abrev.	Sustratos	Abrev.
Hidroxiprolina-β-naftilamida	HPR	L-histidina-β-naftilamida	HIS
L-isoleucina-β-naftilamida	ILE	Sacarosa	SUC1
L-prolina-β-naftilamida	PRO	Sacarosa	SUC2 ¹
L-tirosina-β-naftilamida	TYR	Trehalosa	TRE
Glicina β-naftilamida	GLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosida	AGL1
Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosida	AGL2 ¹
Glicil-L-arginina-4-metoxi-β-naftilamida	GLAR	p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	BGL
Glicil-L-prolina-4-metoxi-β-naftilamida	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosida	BGAL
L-arginil-L-arginina-β-naftilamida	AARG	p-nitrofenil-β-D-fucopiranosida	BDF

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

Sustratos	Abrev.	Sustratos	Abrev.
L-lisil-L-alanina-4-metoxi-β-naftilamida	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido	AGAL
L-alanina-4-metoxi-β-naftilamida	ALA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina	NAG
L-seril-L-tirosina-β-naftilamida	STY	p-nitrofenil-β-D-celobiosa	CELL
Urea	URE	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galactosaminida	NGAL
3-indoxil fosfato	IDX		

1. Se utilizan diferentes formulaciones de los mismos sustratos.

- 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.

NOTA: Si el panel se va a leer en el WalkAway o autoSCAN-4, también se debe inocular el pocillo de LOC.

Incubación

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

Lectura de los paneles

- 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.
- Lea los paneles utilizando luz reflejada de un fondo blanco.
- Después de 4 horas de incubación, añada los reactivos de peptidasa e hidróxido de sodio (NaOH) a los pocillos correspondientes.

- Añada **1 gota** de reactivo de peptidasa a los pocillos de BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY y HIS. Deje que el color se desarrolle durante 30 segundos antes de registrar los resultados. Los resultados se deben registrar en los 3 minutos posteriores a la adición de reactivo. La presencia de CUALQUIER tonalidad de rosa o rojo en la solución en todo el pocillo, o en cualquier parte del pocillo, se interpreta como positivo. Los colores se deben comparar con el pocillo de BNAC. Puede que algunos pocillos aparezcan en un naranja más oscuro que el pocillo de BNAC. Estos se deben registrar como negativos. Las reacciones solo son positivas si hay color rosa o rojo presente en la solución. El color de estos pocillos se oscurecerá con el tiempo. Un color amarillo negativo puede convertirse en un color naranja más oscuro. Esto debe interpretarse como reacción negativa.

NOTA: Tras añadir peptidasa al pocillo de BNAC, debe ser amarillo. Si hay algo de rosa o rojo, no debe usarse el reactivo de peptidasa.

- Añada **1 gota** de 0,05 N de NaOH a los pocillos de AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL y NGAL. Espere al menos 5 segundos, pero no más de 5 minutos, antes de registrar los resultados. Cualquier tonalidad de amarillo debe registrarse como positivo. Compare los pocillos que contienen sustrato con el pocillo de NPC.

NOTA: Puede que estos pocillos aparezcan más oscuros que el pocillo de NPC. Esto debe interpretarse como negativo, pero debe haber un color amarillo para que se considere positivo.

- Se proporcionan dos pocillos de control para ayudar a interpretar las reacciones.
 - BNAC = control de β-naftilamida. Después de añadir el reactivo de peptidasa, este pocillo será de color amarillo.
 - NPC = control de nitrofenil. Este pocillo debe ser incoloro.
- Consulte la sección RESULTADOS para obtener ayuda en la interpretación bioquímica.

NOTA: El WalkAway lee primero pocillos que no requieren reactivos, con el fin de evitar resultados modificados debido a los gases de los reactivos que pueden quedar atrapados bajo la tapa de la bandeja; por tanto, las reacciones bioquímicas no se pueden verificar manualmente.

RESULTADOS

Interpretaciones del sustrato

Well	Reactivo	Positivo	Negativo
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Añada 1 gota de reactivo de peptidasa. Permita que la reacción de color se desarrolle durante al menos 30 segundos, pero no debe superar los 3 minutos.	Cualquier tono de rosa, rojo a magenta en la solución ¹	De amarillo a naranja
SUC1 SUC2 TRE		Cualquier tono marrón o amarillo	Morado
AGL1 BGL BGAL	Realice la comparación con el pocillo de control de NPC.	Cualquier tonalidad de amarillo ²	Claro
URE		De rosa a magenta	De claro/beige a amarillo
IDX		Cualquier tono azul	Claro
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Añada 1 gota de NaOH 0,05 N. Espere al menos 5 segundos, pero no más de 5 minutos, antes de registrar el resultado. Realice la comparación con el pocillo de control de NPC.	Cualquier tonalidad de amarillo ²	Claro

1. Puede que no haya presente un color positivo en todo el pocillo.

2. Puede haber presente un color rosa con algunas levaduras. Esto se debe considerar una reacción positiva.

PRINCIPIOS DE LAS REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

Sustratos de aminoácido-β-naftilamida (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS): cuando el sustrato se hidroliza mediante la enzima adecuada (por lo general, aminoácido-arilamidasa), se libera β-naftilamina. 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.

Carbohidratos (SUC1, SUC2, TRE): la utilización de sacarosa y trehalosa da como resultado una caída del pH que hace que el rojo de clorofenol cambie de morado a amarillo. Estas reacciones de carbohidratos son selectivas y puede que no se ajusten a las reacciones convencionales.

Sustratos de nitrofenil (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL): si está presente la enzima adecuada, el sustrato se rompe liberando ortonitrofenol o paranitrofenol. Con un pH alcalino, estos compuestos son de color amarillo. Si la reacción se produce con un pH ácido, se debe añadir NaOH tras la incubación antes de poder leer los resultados. Los pocillos pueden ser incoloros o de un color amarillo claro antes de añadir el hidróxido de sodio.

Indoxil fosfatasa (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 azul grisáceo.

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 rojo fenol cambia de amarillo a rojo.

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El libro de códigos rápido de los biotipos de levaduras 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 MicroScan para los análisis incluidos en el panel de identificación. El libro de códigos de los biotipos de levaduras se basa en un análisis por ordenador de las 27 pruebas en el panel rápido de identificación de levaduras. Los resultados de las pruebas se transforman en un número de biotipo de 9 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 total 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 ejemplo, el número de biotipo se ha añadido incorrectamente o se ha registrado de forma errónea 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

1. Los paneles rápidos de identificación de levaduras están diseñados para la identificación de levaduras y de organismos semejantes a las levaduras (p. ej., *Prototheca*). Debe tenerse precaución con los microorganismos con producción de hifas excesiva.
2. Si se enumera más de una identificación de especies para un número de biotipo particular, puede que sean necesarias pruebas complementarias. Los procedimientos de identificación aceptados para las levaduras y para microorganismos semejantes a la levadura incluyen la morfología colonial, el crecimiento a temperatura elevada, la formación de pigmento y color en el agar de fenoloxidasa. La morfología microscópica en medios diseñados para obtener la morfología típica también puede ayudar en la identificación de estos microorganismos. Consulte los procedimientos de referencia de micología correspondientes.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. La variación en los resultados cromogénicos puede producirse debido a una inoculación excesiva o deficiente del sistema. Cada inóculo debe compararse con el estándar de turbidez para lograr la concentración correcta de inóculo para un rendimiento óptimo.

CONTROL DE CALIDAD

La validez de los sustratos de identificación se debe comprobar analizando los microorganismos con reacciones conocidas. Los resultados de cada reacción para los microorganismos de control MicroScan recomendados se encuentran en el gráfico de control de calidad de este manual.

Tabla de control de calidad de los sustratos de identificación rápida de levaduras

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Las especificaciones de CC sombreadas que aparecen en la tabla de arriba se implementarán en las versiones del software de LabPro 1.90 o superiores.

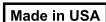
1. American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.
2. Se puede obtener un resultado positivo con *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.
3. Se puede obtener un resultado negativo con *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Puede que deban comprobarse las lecturas de los instrumentos.
5. Se puede obtener un resultado positivo con *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Nota: Los microorganismos de control de calidad se seleccionan para proporcionar reacciones positivas/negativas para todos los sustratos de identificación. Por esto, la identificación del microorganismo puede diferir de aquella indicada en el gráfico de CC. La aceptabilidad del rendimiento del producto debe determinarse por la comparación de los resultados de las pruebas y no por la identificación.

DECLARACIÓN DE GARANTÍA

El sistema está cubierto y sujeto a las cláusulas de garantía incluidas en su acuerdo de contrato para el sistema o sus reactivos. El cliente es responsable de llevar a cabo los procedimientos de mantenimiento preventivo ordinarios. Las reparaciones cuya causa se pueda atribuir a no realizar dichos procedimientos de mantenimiento en los intervalos de tiempo indicados se harán según el criterio de Beckman Coulter e irán a cargo del cliente.

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
	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

Lista de símbolos			
Símbolo	Título del símbolo	Descripción del estándar	Estándar
	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 ID rápida de leveduras

REF B1017-70

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Painel de identificação rápida de leveduras foi concebido para uma rápida identificação de leveduras e de espécies semelhantes a leveduras isoladas de amostras clínicas.

SUMÁRIO E FUNDAMENTO

São utilizados testes cromogénicos e convencionais modificados para a identificação de espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas. O Painel de identificação rápida de leveduras é um painel de microdiluição de 96 poços que utiliza 27 substratos desidratados (consulte a Tabela 1-1). É utilizada uma suspensão densa de levedura em água autoclavada para reidratar os substratos. É obtida uma identificação após a incubação do painel a 35–37 °C durante 4 horas.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Os Painéis de identificação rápida de leveduras destinam-se apenas para fins de diagnóstico *in vitro*.
2. Não permita que o reagente peptidase ou hidróxido de sódio ou qualquer um dos substratos de identificação entrem em contacto com os olhos, pele ou vestuário.
3. Cumpra 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

Armazene os painéis e o reagente peptidase a 2–8 °C.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Não classificado como perigoso



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

COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Consulte o Manual of Clinical Microbiology (Manual de microbiologia clínica) da American Society for Microbiology¹ ou outros manuais de referência de micologia para obter informações sobre os procedimentos recomendados para o transporte e isolamento de leveduras. Os testes cromogénicos rápidos são baseados na presença de enzimas pré-formadas no organismo desconhecido.^{2,3,4} Assim, o meio de placa no qual o organismo cresce irá influenciar os resultados dos testes, devido à indução de enzimas diferentes por meios diferentes. O Painel de identificação rápida de leveduras encontra-se baseado na utilização de ágar sabouraud dextrose (quer padrão ou modificação de Emmons). A presença de antibióticos no meio de crescimento não é uma variável crítica; no entanto, não devem ser utilizados meios contendo sangue, ágar de extrato de levedura–extrato de malte (YM) e ágar de bolor inibidor (IMA).

MATERIAIS FORNECIDOS

Painéis de identificação rápida de leveduras (B1017-70)

Folha de trabalho

Manual de procedimentos

Gráfico de controlo de qualidade

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Água para inóculo (B1015-2)

0,05 N de hidróxido de sódio (B1015-3)

Reagente peptidase (B1012-30B)

Padrão de turvação para leveduras (B1015-18)

Tabuleiros de cobertura (B1010-56B)

Livro de códigos de biótipos de levedura MicroScan (B1014-1A)

Ansas de inoculação

Placas de ágar sabouraud dextrose

Vórtex

Pipeta de 50 µL com pontas

Incubadora (35–37 °C), sem CO₂
 Organismos de controlo de qualidade:
Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDIMENTO

Preparação de painéis

1. Retire os painéis a utilizar do local de armazenamento. **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. Inocule o Painel de identificação rápida de leveduras com um organismo em crescimento ativo. As colónias de um isolamento primário em placas de ágar sabouraud dextrose podem ser utilizadas se apresentarem crescimento suficiente. Se necessário, efetue uma subcultura do isolado de levedura numa placa de ágar sabouraud dextrose e incube até que ocorra um crescimento suficiente. Recomenda-se a incubação durante 48 horas a 30 °C ou durante 48 a 72 horas a 25 °C (temperatura ambiente).

NOTA: As culturas incubadas durante um período de tempo superior a 48 horas a 30 °C apenas devem ser utilizadas se for necessária uma incubação adicional para atingir o crescimento adequado.

2. Utilizando uma cotonete esterilizada ou uma ansa de inoculação, remova o crescimento da placa de ágar e emulsione em 3 mL de água para inóculo (água desionizada autoclavada num tubo de amostra de 13 x 84 mm ou 13 x 100 mm). Cada suspensão deve ser comparada e equivalente ao Padrão de turvação para leveduras MicroScan. A comparação com a suspensão para inóculo de teste e o Padrão de turvação para leveduras deve ser realizado utilizando uma fonte de luz adequada e comparando os tubos de amostra com um cartão branco com linhas de contraste pretas.

NOTA: Tenha o cuidado de se certificar de que nenhum meio de ágar é removido com o organismo.

3. Misture ou agite em vórtex a suspensão até que esta fique homogénea. Algumas estripes de levedura não dispersam facilmente na água. Se não for alcançada uma suspensão homogénea com agitação em vórtex, deixe a suspensão repousar durante 10–15 minutos e volte a agitar em vórtex. Se a suspensão ainda apresentar agregados, permita que estes se instalem no fundo do tubo de amostra e utilize o sobrenadante para inocular o painel de leveduras. A turvação do sobrenadante deve corresponder à do Padrão de turvação para leveduras MicroScan. Se não corresponder, transfira mais crescimento à água para inóculo e repita o procedimento acima.

NOTA: NÃO pipete agregados de células no painel de leveduras.

Inoculação do painel

1. Etiquete o painel com o número da amostra.
2. Adicione 50 µL de suspensão de levedura a cada poço contendo substrato e aos poços de controlo BNAC e NPC. Não é recomendável a utilização de uma pipeta Pasteur para inoculação.

Tabela 1-1, Substratos

Substratos	Abrev.	Substratos	Abrev.
Hidroxiprolina-β-naftilamida	HPR	L-histidina-β-naftilamida	HIS
L-isoleucina-β-naftilamida	ILE	Sacarose	SUC1
L-prolina-β-naftilamida	PRO	Sacarose	SUC2 ¹
L-tirosina-β-naftilamida	TYR	Trealose	TRE
Glicina β-naftilamida	GLY	p-nitrofenilo-α-D-glucopiranosídeo	AGL1
Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY	p-nitrofenilo-α-D-glucopiranosídeo	AGL2 ¹
Glicil-L-arginina-4-metoxi-β-naftilamida	GLAR	p-nitrofenilo-β-D-glucopiranosídeo	BGL
Glicil-L-prolina-4-metoxi-β-naftilamida	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	BGAL
L-arginil-L-arginina-β-naftilamida	AARG	p-nitrofenilo-β-D-fucopiranosídeo	BDF

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Substratos	Abrev.	Substratos	Abrev.
L-lisil-L-alanina-4-metoxi-β-naftilamida	LYAL	p-nitrofenilo-α-D-galactopiranosido	AGAL
L-alanina-4-metoxi-β-naftilamida	ALA	p-nitrofenilo-N-acetil-β-D-glucosamina	NAG
L-seril-L-tirosina-β-naftilamida	STY	p-nitrofenilo-β-D-celobiose	CELL
Ureia	URE	p-nitrofenilo-N-acetil-β-D-galactosaminida	NGAL
3-fosfato de indoxil	IDX		

1. São utilizadas formulações diferentes dos mesmos substratos.

- 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.

NOTA: Se o painel se destinar a ser lido no WalkAway ou no autoSCAN-4, o poço LOC também deve ser inoculado.

Incubação

- Empilhe os painéis em grupos de três a cinco, com um tabuleiro de cobertura sobre o painel superior para evitar evaporação.
- Incube os painéis inoculados durante 4 horas, a 35–37 °C, numa incubadora sem CO₂.

Leitura dos painéis

- Retire o reagente peptidase do frigorífico pelo menos 30 minutos antes de realizar a leitura dos painéis. O reagente peptidase pode precipitar-se a 4 °C, mas voltará a dissolver-se à temperatura ambiente. Não exponha o reagente peptidase a temperaturas elevadas para agilizar a redissolução do precipitado cristalino, uma vez que as temperaturas elevadas causam a degradação do reagente.
- Efetue a leitura dos painéis utilizado luz refletida por um fundo branco.
- Após 4 horas de incubação, adicione os reagentes peptidase e hidróxido de sódio (NaOH) aos poços adequados.

- Adicione **uma gota** de reagente peptidase aos poços BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS. Permita o desenvolvimento de cor durante 30 segundos antes de registar os resultados. Os resultados podem ser registados dentro de 3 minutos após a adição de reagente. A presença de QUALQUER tonalidade de rosa ou vermelho na solução ao longo de todo o poço ou em qualquer porção do poço é interpretada como positiva. As cores devem ser comparadas ao poço BNAC. Alguns poços podem apresentar uma cor laranja mais escura do que o poço BNAC. Estes devem ser registados como negativos. As reações são positivas apenas se estiver presente uma cor rosa ou vermelha na solução. A cor nestes poços irá tornar-se mais escura com o passar do tempo. Uma cor amarela negativa pode tornar-se uma cor laranja mais escura. Tal deve ser interpretado como uma reação negativa.

NOTA: Após a adição de peptidase ao poço BNAC, este deverá apresentar-se amarelo. Caso se verifique qualquer coloração rosa ou vermelha, o reagente peptidase não deverá ser utilizado.

- Adicione **uma gota** de 0,05 N de NaOH aos poços AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL e NGAL. Aguarde pelo menos 5 segundos, mas não mais do que 5 minutos, antes de registar resultados. Qualquer tonalidade de amarelo deve ser registada como positiva. Compare os poços contendo substrato ao poço NPC.

NOTA: Estes poços podem apresentar uma coloração mais escura do que os poços NPC. Tal deverá ser interpretado como negativo, mas uma cor amarela deve encontrar-se presente para ser considerado positivo.

- 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 irá apresentar uma cor amarela.
 - NPC = Controlo de nitrofenilo. Este poço deve apresentar-se incolor.
- Consultar a secção RESULTADOS para obter ajuda sobre a interpretação bioquímica.

NOTA: O WalkAway efetua a leitura de poços que não necessitam de reagentes em primeiro lugar para prevenir resultados alterados devido a vapores de reagentes que podem ficar aprisionados debaixo da tampa do tabuleiro, impedindo, desta forma, a verificação manual de reações bioquímicas.

RESULTADOS

Interpretações de substrato

Well	Reagente	Positivo	Negativo
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Adicione uma gota de reagente peptidase. Permita o desenvolvimento de reação de cor durante, pelo menos, 30 segundos, mas não mais do que 3 minutos.	Qualquer tonalidade de rosa, vermelho a magenta na solução ¹	Amarelo a laranja
SUC1 SUC2 TRE		Qualquer tonalidade de castanho ou amarelo	Púrpura
AGL1 BGL BGAL	Compare com poço de controlo NPC.	Qualquer tonalidade de amarelo ²	Claro
URE		Rosa a magenta	Transparente/bege a amarelo
IDX		Qualquer tonalidade de azul	Claro
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Adicione uma gota de 0,05 N de NaOH. Aguarde pelo menos 5 segundos, mas não mais do que 5 minutos, antes de registar o resultado. Compare com poço de controlo NPC.	Qualquer tonalidade de amarelo ²	Claro

1. Uma cor positiva pode não estar presente ao longo de todo o poço.

2. Em algumas leveduras, poderá estar presente uma cor rosa. Tal deve ser considerado uma reação positiva.

PRINCÍPIOS DAS REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO

Substratos de aminoácidos β -naftilamida (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) — Quando o substrato é hidrolisado pela enzima apropriada (normalmente um aminoácido arilamidase), é libertada β -naftilamina. A β -naftilamina é detetada através da adição de p-dimetilaminobenzaldeído (no reagente peptidase), que cria um complexo de cor rosa arroxeada.

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.

Hidratos de carbono (SUC1, SUC2, TRE) — A utilização de sucrose e de trealose origina uma descida de pH que causa a alteração do vermelho de clorofenol de roxo para amarelo. Estas reações de hidratos de carbono são seletivas e podem não estar em conformidade com reações convencionais.

Substratos de nitrofenilo (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) — Se a enzima apropriada estiver presente, o substrato é clivado, libertando orto-nitrofenol ou para-nitrofenol. Com um pH alcalino, estes compostos são amarelos. Se a reação ocorrer com um pH ácido, o NaOH deve ser adicionado após a incubação, antes que os resultados possam ser lidos. Antes da adição de hidróxido de sódio, os poços podem apresentar-se incolores ou amarelos-pálidos.

Fosfatase 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 acinzentado.

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 vermelho de fenol de amarelo para vermelho.

IDENTIFICAÇÃO DO ORGANISMO

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

O Livro de códigos de leveduras foi baseado numa análise computadorizada de 27 testes no Pannel de identificação rápida de leveduras. Os resultados do teste são transformados num número de biótipo com nove dígitos, 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 total cumulativo de 99,9%.

Em caso de ocorrência de um número de biótipo que não se encontre no Livro de códigos, dever-se-á suspeitar, em primeiro lugar, de um erro de procedimento. Por exemplo, o número de biótipo pode ter sido incorretamente adicionado ou uma reação pode ter sido registada de forma errónea. 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 adequadamente túrbida. Se, após a repetição dos testes, obtiver os mesmos resultados, consulte o Serviço de procura de biótipos no site da Beckman Coulter ou consulte o seu distribuidor local.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. Os Painéis de identificação rápida de leveduras destinam-se à identificação de leveduras e de organismos semelhantes a leveduras (por exemplo, *Prototheca*). Devem ser tomados cuidados relativamente a organismos responsáveis pela produção excessiva de hifas.
2. Se a um determinado número de biótipo corresponder mais do que uma identificação de espécie, poderão ser necessários testes suplementares. Os procedimentos de identificações aceites para leveduras e organismos semelhantes a leveduras incluem morfologia colonial, crescimento a temperatura elevada, formação de pigmentos e coloração no ágar fenoxidase. A morfologia microscópica em meios designados para desencadear uma morfologia típica pode também auxiliar na identificação destes organismos. Consulte os procedimentos de referência de micologia apropriados.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Podem ocorrer variações nos resultados cromogénicos devido à sobre ou subinoculação excessivas do sistema. Cada inóculo deve ser comparado ao padrão de turvação para ser alcançada a concentração correta de inóculo para garantir um desempenho ideal.

CONTROLO DE QUALIDADE

A aceitabilidade dos substratos de identificação deve ser verificada através de testes com organismos de reações conhecidas. Os resultados de cada reação dos organismos de controlo MicroScan recomendados encontram-se no Gráfico de controlo de qualidade neste manual.

Gráfico de controlo de qualidade dos substratos de identificação rápida de leveduras

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

As especificações de CQ a sombreado na tabela acima serão implementadas nas versões do software LabPro ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

2. É possível obter um resultado positivo com *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.

3. É possível obter um resultado negativo com *Candida lusitanae*, ATCC 66035.

4. As leituras do instrumento podem exigir uma verificação visual.
5. É possível obter um resultado positivo com *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Nota: Os organismos de controlo de qualidade são selecionados para fornecer reações positivas/negativas para todos os substratos de identificação. Consequentemente, a identificação de organismos poderá ser diferente da indicada no gráfico de CQ. A aceitabilidade do desempenho do produto deve ser determinada por comparação dos resultados dos testes, não pela identificação.

DECLARAÇÃO DE GARANTIA

O sistema é abrangido por e está sujeito às disposições da garantia incluídas no acordo contratual relativo ao sistema ou respetivos reagentes. O cliente é responsável pelos procedimentos de manutenção preventiva de rotina. As reparações que surjam devido à não realização destes procedimentos de manutenção nos intervalos de tempo indicados são efetuadas ao critério da Beckman Coulter, sendo as despesas suportadas pelo cliente.

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
	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

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Designação do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	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 hurtiggjær-ID

REF B1017-70

ANVENDELSESOMRÅDE

Hurtiggjær-identifikasjonspanelet er designet for hurtig identifikasjon av gjær og gjærliknende arter isolert fra kliniske prøver.

SAMMENDRAG OG PRINSIPP

Kromogene og modifiserte konvensjonelle tester brukes for å identifisere gjærarter som er isolert fra kliniske prøver. Hurtiggjær-identifikasjonspanelet er et mikrofortynningspanel med 96 brønner som benytter 27 dehydrerte substrater (se Tabell 1-1). En tung suspensjon av gjæret i autoklavert vann brukes til å rehydrere substratene. En identifikasjon oppnås etter inkubasjon av panelet ved 35–37 °C i 4 timer.

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. Hurtiggjær-identifikasjonspaneler er kun til *in vitro*-diagnostisk bruk.
2. Ikke la peptidase- eller natriumhydroksidreagens 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 oppmerksomhet på at de inokulerte panelene inneholder potensielt patogene organismer.
4. Alle materialer skal autoklaveres før avhending.

OPPBEVARING

Oppbevar paneler og peptidasereagens ved 2–8 °C.

GHS-FAREKLASSIFISERING

Ikke klassifisert som farlig



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på techdocs.beckmancoulter.com

PRØVEINNSAMLING OG KLARGJØRING

Se American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology¹ (Håndbok for klinisk mikrobiologi) eller andre mykologi-referansehandbøker for anbefalte prosedyrer for transport og isolasjon av gjær. Hurtige kromogene tester er basert på nærvær av preformede enzymer i den ukjente organismen.^{2,3,4} Dermed vil platemediet som organismen dyrkes på, påvirke testresultatene på grunn av induksjonen av forskjellige enzymer av forskjellige medier. Hurtiggjær-identifikasjonspanelet er basert på bruken av Sabouraud-dekstroseagar (enten standard eller Emmons' modifikasjon). Nærværet av antibiotika i vekstmediet er ikke en kritisk variabel, men media som inneholder blod, gjærekstrakt-maltekstrakt (YM)-agar og hemmende soppar (IMA) bør ikke brukes.

MEDFØLGENDE MATERIALER

Hurtiggjær-identifikasjonspaneler (B1017-70)

Arbeidsark

Prosedyrehandbok

Kvalitetskontrolltabell

PÅKREVDE MATERIALER SOM IKKE MEDFØLGER

Inokulumvann (B1015-2)

0,05N natriumhydroksid (B1015-3)

Peptidasereagens (B1012-30B)

Gjærturbiditetsstandard (B1015-18)

Dekselbrett (B1010-56B)

MicroScan gjærbiotypekodebok (B1014-1A)

Inokulerende løkker

Skåler med Sabouraud-dekstroseagar

Vortexblander

50 µL-pipette med spisser

Inkubator (35–37 °C), uten CO₂

Kvalitetskontrollorganismer:

Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROSEDYRE

Klargjøring av paneler

1. Ta panelene som skal brukes, ut fra oppbevaringsstedet. **Paneler skal ikke brukes hvis tørkemiddelet ikke er til stede eller er ødelagt eller hvis pakken er ødelagt (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. Inokuler hurtiggjær-identifikasjonspanelet med en aktivt voksende organisme. Kolonier fra en primær isolasjon i skål med Sabouraud-dekstroreagar kan brukes hvis det er nok vekst til stede. Om nødvendig, subdyrk gjærisolatet i en skål med Sabouraud-dekstroreagar og inkuber til det er nok vekst. Inkubasjon i 48 timer ved 30 °C eller 48 til 72 timer ved 25 °C (romtemperatur) anbefales.

MERK: Kulturer som inkuberes i mer enn 48 timer ved 30 °C, bør brukes bare hvis ytterligere inkubasjon trengs for å oppnå tilstrekkelig vekst.

2. Bruk en steril vattpinne eller inokulerende løkke til å fjerne vekst fra agarskålen og emulger i 3 mL inokuleringsvann (autoklavert, avionisert vann i et 13 x 84 mm- eller 13 x 100 mm prøverør). Hver suspensjon må sammenlignes og tilsvare MicroScan gjærturbiditetsstandarden. Sammenligningen med testinokulumsuspensjonen og gjærturbiditetsstandarden bør skje med egnet lyskilde og ved å sammenligne prøverørene med et hvitt kort med svarte kontrastlinjer.

MERK: Pass på å sikre at ikke noe agarmedium fjernes med organismen.

3. Bland eller vorteks suspensjonen til den er homogen. Noen gjærstammer løses ikke lett opp i vann. Hvis vorteksprosedyren ikke resulterer i en homogen suspensjon, la suspensjonen hvile i 10–15 minutter før en ny vorteks utføres. Hvis det fortsatt er klumper i suspensjonen, la dem falle til bunns i prøverøret og bruk supernatant for å inokulere gjærpanelet. Turbiditeten til supernatanten må samsvare med MicroScan-gjærturbiditetsstandarden. Hvis ikke, overfør mer vekst til inokulumvannet og gjenta ovennevnte prosedyre.

MERK: IKKE pipetter klumper av celler i gjærpanelet.

Panelinokulering

1. Merk panelet med prøvenummer.
2. Tilsett 50 µL gjærsuspensjon til hver brønn som inneholder substrat, pluss kontrollbrønnene BNAC og NPC. Bruk av en Pasteur-pipette for inokulering anbefales ikke.

Tabell 1-1, Substrater

Substrater	Fork.	Substrater	Fork.
Hydroxyprolin-β-naftylamid	HPR	L-histidin-β-naftylamid	HIS
L-isleucin-β-naftylamid	ILE	Sukrose	SUC1
L-prolin-β-naftylamid	PRO	Sukrose	SUC2 ¹
L-tyrosin-β-naftylamid	TYR	Trehalose	TRE
Glysin-β-naftylamid	GLY	p-nitrofenyl-α-D-glukopyranosid	AGL1
Glysyglysin-β-naftylamid	GGLY	p-nitrofenyl-α-D-glukopyranosid	AGL2 ¹
Glycyl-L-arginin-4-metoksy-β-naftylamid	GLAR	p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid	BGL
Glycyl-L-prolin-4-metoksy-β-naftylamid	GLPR	o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid	BGAL
L-arginyl-L-arginin-β-naftylamid	AARG	p-nitrofenyl-β-D-fukopyranosid	BDF
L-lysyl-L-alanin-4-metoksy-β-naftylamid	LYAL	p-nitrofenyl-α-D-galaktopyranosid	AGAL
L-alanin-4-metoksy-β-naftylamid	ALA	p-nitrofenyl-N-acetyl-β-D-glukosamin	NAG
L-seryl-L-tyrosin-β-naftylamid	STY	p-nitrofenyl-β-D-cellobiose	CELL
Urea	URE	p-nitrofenyl-N-acetyl-β-D-galaktosaminid	NGAL
3-indoksyl-fosfat	IDX		

1. Forskjellige formuleringer brukes av de samme substratene.

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.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

MERK: Hvis panelet skal leses på WalkAway eller autoSCAN-4, må LOC-brønneren også inokuleres.

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.

3. Etter 4 timers inkubasjon, tilsett peptidase- og natriumhydroksidreagenser (NaOH) til de riktige brønnene.

- A. Tilsett **1 dråpe** peptidasereagens til BNAC-, HPR-, ILE-, PRO-,TYR-, GLY-, GGLY-, GLAR-, GLPR-, AARG-, LYAL-, ALA-, STY- og HIS-brønnene. La fargen utvikles i 30 sekunder før resultatene registreres. Resultater må registreres innen 3 minutter etter tilsetting av reagens. Nærvær av ENHVER nyanse av rosa eller rødt i løsningen i hele brønneren eller en del av brønneren, tolkes som positiv. Fargene bør sammenlignes med BNAC-brønneren. Noen brønner kan utvikle en mørkere oransje enn BNAC-brønneren. Disse bør registreres som negative. Reaksjoner er positive bare hvis det er rosa eller rødt i løsningen. Fargen i disse brønnene vil bli mørkere med tiden. En negativ gulfarge kan bli en mørkere oransje. Dette skal tolkes som en negativ reaksjon.

MERK: Når peptidase er tilsatt i BNAC-brønneren, skal den være gul. Hvis det forekommer rosa eller rødt, skal ikke peptidasereagenset brukes.

- B. Tilsett **1 dråpe** 0,05N NaOH til AGL2-, BDF-, AGAL-, NPC-, NAG-, CELL- og NGAL-brønnene. Vent i minst 5 sekunder, men ikke lenger enn 5 minutter, før resultatene registreres. Enhver nyanse av gul skal registreres som positiv. Sammenlign brønnene som inneholder substrat med NPC-brønneren.

MERK: Disse brønnene kan virke mørkere enn NPC-brønneren. Dette skal tolkes som negativ, men en gulfarge må fremstå for å anses som positiv.

4. To kontrollbrønner leveres for å bistå i tolkning av reaksjonene.

- A. BNAC = β -naftylamidkontroll. Etter tilsetting av peptidasereagens, vil denne brønneren bli gul.

- B. NPC = nitrofenylkontroll. Denne brønneren skal være klar.

5. Se avsnittet RESULTATER for å få hjelp til biokjemisk tolkning.

MERK: WalkAway leser av brønner som ikke først trenger reagenser for å forhindre endrede resultater på grunn av damp som kan være fanget under brettlokket. Derfor kan ikke biokjemiske reaksjoner verifiseres manuelt.

RESULTATER

Substrat-tolkninger

Well	Reagens	Positiv	Negativ
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Tilsett 1 dråpe peptidasereagens. La fargereaksjonen utvikles i minst 30-sekunder, men ikke lenger enn 3 min.	Enhver nyanse av rosa, rød til magenta i løsningen ¹	Gult til oransje
SUC1 SUC2 TRE		Enhver nyanse av brun eller gul	Lilla
AGL1 BGL BGAL	Sammenlign med NPC-kontrollbrønneren.	Enhver nyanse av gul ²	Klar
URE		Rosa til magenta	Klar/beige til gul
IDX		Enhver nyanse av blå	Klar

Well	Reagens	Positiv	Negativ
AGL2	Tilsett 1 dråpe 0,05 N NaOH. Vent i minst 5 sekunder, men ikke lenger enn 5 minutter, før resultatet registreres. Sammenlign med NPC-kontrollbrønnen.	Enhver nyanse av gul ²	Klar
BDF			
AGAL			
NAG			
CELL			
NGAL			

1. En positiv farge trenger ikke være tilstede gjennom hele brønnen.

2. En rosafarge kan forekomme med enkelte gjærtyper. Dette bør anses som en positiv reaksjon.

PRINSIPPER FOR IDENTIFISERINGSREAKSJONER

Aminosyre β-naftylamidsubstrater (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Når substratet hydrolyseres av det riktige enzymet (vanligvis en aminosyre-arylamidase), frigis β-naftylamin. β-naftylamin påvises ved tilsetting av p-dimetylaminocinnamaldehyd (i peptidasereagenset) 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.

Karbohydrater (SUC1, SUC2, TRE) – Anvendelsen av sukrose og trehalose resulterer i en pH-reduksjon som fører til at klorofenolrødt endres fra lilla til gul. Disse karbohydratreaksjonene er selektive og vil kanskje ikke samsvare med tradisjonelle reaksjoner.

Nitrofenyl-substrater (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Hvis riktig enzym forekommer, spaltes substratet slik at orto- eller para-nitrofenol frigis. Ved alkalisk pH, blir disse forbindelsene gule. Hvis reaksjonen forekommer ved sur pH, må NaOH tilsettes etter inkubasjon før resultatene kan leses av. Brønnene kan enten være fargeløse eller svakt gule før natriumhydroksid tilsettes.

Indoksyf-fosfatase (IDX) – Indoksyf-fosfat spaltes av en fosfatase for å frigi indoksyf. Indoksyfet kombineres med oksygen for å danne indigoblå, som er et uløselig blått eller blå-grått presipitat.

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 rød.

IDENTIFISERING AV ORGANISME

MicroScan-hurtiggjær-biotypekodebok brukes for å identifisere ukjente testorganismer. Denne kodeboken er generert fra MicroScans database for testene som er inkludert på identifikasjonspanelet. Gjærkodeboken er basert på en dataanalyse av de 27 testene på hurtiggjær-identifikasjonspanelet. Testresultatene forvandles til et 9-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 sum på 99,9 %.

Dersom et biotypenummer forekommer som ikke står i kodeboken, bør man først mistenke en prosedyrefeil, f.eks. at biotypenummeret er lagt til feil eller en reaksjon er feilaktig registrert. Hvis biotypenummeret er riktig, bør muligheten for blandet kultur sjekkes og organismen bør testes på nytt, med spesiell vekt på bruk av en tilstrekkelig turbid celleduspensjon. Hvis en ny test gir de samme resultatene, se Biotypesøketjeneste på Beckman Coulter nettside eller ta kontakt med din lokale distributør.

PROSEDYREBEGRENSNINGER

- Hurtiggjær-identifikasjonspaneler er designet for identifikasjon av gjær- og gjærlignende organismer (f.eks. *Prototheca*). Varsomhet må utvises med organismer med for stor produksjon av sopp.
- Hvis mer enn én artsidentifisering er oppgitt for et bestemt biotypenummer, kan flere tester være nødvendige. Aksepterte identifikasjonsprosedyrer av gjær og gjærlignende organismer inkluderer kolonial morfologi, vekst ved forhøyet temperatur, pigmentdannelse og farge på fenoloksidaseagar. Mikroskopisk morfologi på medier designet for å fremkalle typisk morfologi, kan også bistå i identifikasjon av disse organismene. Se egnede mykologireferanseprosedyrer.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
- Variasjon i kromogene resultater kan forekomme som følge av for mye over- eller underinokulering av systemet. Hvert inokulum må sammenlignes med turbiditetsstandarden for å oppnå riktig konsentrasjon av inokulum for optimal ytelse.

KVALITETSKONTROLL

Identifikasjonssubstratenes akseptabilitet skal sjekkes ved å teste organismer med kjente reaksjoner. Resultatene for hver reaksjon for anbefalte MicroScan-kontrollorganismer står i kvalitetskontrolltabellen i denne håndboken.

Kvalitetskontrolltabell for hurtiggjør-identifikasjonssubstrater

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Skyggelagte kvalitetskontrollspesifikasjoner i tabellen ovenfor vil bli implementert i LabPro-programvareversjoner ≥ 1.90 .

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Et positivt resultat kan oppnås med *Rhodotorula rubra* ATCC 66034.
3. Et negativt resultat kan oppnås med *Candida lusitanae* ATCC 66035.
4. Instrumentavlesninger kan kreve visuell verifisering.
5. Et positivt resultat kan oppnås med *Cryptococcus laurentii* ATCC 66036.

Merk: Kvalitetskontrollorganismer velges for å gi positive/negative reaksjoner for alle identifikasjonssubstrater. Som resultat av dette, kan organismeidentifikasjonen variere i forhold til det som er oppgitt i kvalitetskontrolltabellen. Produktutførelsens akseptabilitet bør bestemmes ved sammenligning av testresultater, ikke identifikasjon.

GARANTI

Systemet er dekket av og underlagt bestemmelsene i garantien som er omfattet i kontraktavtalen for systemet eller dets reagenser. Kunden er ansvarlig for å utføre rutinemessig forebyggende vedlikeholdsarbeid. Reparasjoner som skyldes at dette vedlikeholdsarbeidet ikke utføres ved de angitte tidsintervallene, utføres etter skjønn fra Beckman Coulter og på kundens regning.

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

Symbolnøkkel			
Symbol	Symboltittel	Beskrivelse av standard	Standard
	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
	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
	In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	Angir medisinsk utstyr som er beregnet for bruk som in vitro-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 ζυμομυκήτων

REF B1017-70

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων έχει σχεδιαστεί για την ταχεία ταυτοποίηση ζυμομυκήτων και ειδών που προσομοιάζουν με ζυμομύκητες κατόπιν απομόνωσης από κλινικά δείγματα.

ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΑΡΧΗ

Για την ταυτοποίηση ειδών ζυμομυκήτων που έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα χρησιμοποιούνται χρωμογονικές και τροποποιημένες συμβατικές εξετάσεις. Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων είναι μια πλάκα μικροαραίωσης 96 βοθρίων που χρησιμοποιεί 27 αφυδατωμένα υποστρώματα (βλ. Πίνακα 1-1). Για την επανενυδάτωση των υποστρωμάτων χρησιμοποιείται βαρύ εναιώρημα του ζυμομύκητα σε ύδωρ αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο. Η λήψη ταυτοποίησης επιτυγχάνεται μετά την επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία 35–37 °C επί 4 ώρες.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Οι πλάκες ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων προορίζονται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
2. Μην αφήνετε το αντιδραστήριο πεπτιδάσης ή υδροξειδίου του νατρίου ούτε κανένα υπόστρωμα ταυτοποίησης να έρθει σε επαφή με τα μάτια, το δέρμα ή τα ρούχα.
3. Πρέπει να εφαρμόζονται άσπτες τεχνικές και οι καθιερωμένες προφυλάξεις έναντι των μικροβιολογικών κινδύνων καθ' όλη τη διάρκεια όλων των διαδικασιών και να λαμβάνεται υπόψη ότι οι ενοφθαλμισμένες πλάκες περιέχουν δυνητικώς παθογόνους μικροοργανισμούς.
4. Πριν από την απόρριψη, όλα τα υλικά θα πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Αποθηκεύετε τις πλάκες και το αντιδραστήριο πεπτιδάσης σε θερμοκρασία 2–8 °C.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο



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

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ανατρέξτε στο Manual of Clinical Microbiology' (Εγχειρίδιο κλινικής μικροβιολογίας) της Αμερικανικής Εταιρείας Μικροβιολογίας ή σε άλλα μυκητολογικά εγχειρίδια αναφοράς για πληροφορίες σχετικά με τις συνιστώμενες διαδικασίες μεταφοράς και απομόνωσης ζυμομυκήτων. Οι χρωμογονικές εξετάσεις ταχείας ταυτοποίησης βασίζονται στην παρουσία προσχηματισμένων ενζύμων εντός του άγνωστου μικροοργανισμού.^{2,3,4} Επομένως, το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται επί των πλακών για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού επηρεάζει τα αποτελέσματα της εξέτασης λόγω της επαγωγής διαφορετικών ενζύμων από τα διάφορα θρεπτικά υλικά. Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων βασίζεται στη χρήση άγαρ δεξτρόζης Sabouraud (είτε τυποποιημένου είτε τροποποιημένου κατά Emmon's). Η παρουσία αντιβιοτικών στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης δεν αποτελεί μεταβλητή κρίσιμης σημασίας, ωστόσο δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται θρεπτικά υλικά που περιέχουν αίμα, άγαρ με εκχύλισμα ζυμομύκητα-εκχύλισμα βύνης (YM) και ανασταλτικό άγαρ ευρωτομυκήτων (IMA).

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Πλάκες ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων (B1017-70)

Φύλλο εργασίας

Εγχειρίδιο διαδικασιών

Πίνακας ποιοτικού ελέγχου

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Ύδωρ ενοφθαλμισμού (B1015-2)

Υδροξείδιο νατρίου 0,05 N (B1015-3)

Αντιδραστήριο πεπτιδάσης (B1012-30B)

Πρότυπο θολερότητας για ζυμομύκητες (B1015-18)

Καλυπτρίδες (B1010-56B)

Βιβλίο κωδικοποίησης βιοτύπων ζυμομυκήτων MicroScan (B1014-1A)

Κρικοφόροι στειλεοί ενοφθαλμισμού

Τρυβλία άγαρ δεξτρόζης Sabouraud

Αναμίκτης Vortex

Αυτόματος διανομέας 50 µL με ρύγχη

Μονάδα επώασης (35–37 °C), χωρίς CO₂

Μικροοργανισμοί ποιοτικού ελέγχου:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των πλακών

1. Αφαιρέστε τις πλάκες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν από τον χώρο φύλαξης. **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. Ενοφθαλμίστε την πλάκα ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων με μικροοργανισμό σε ενεργή ανάπτυξη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποικίες από τρυβλίο με άγαρ δεξτρόζης Sabouraud αρχικής απομόνωσης, εάν υπάρχει επαρκής ανάπτυξη. Αν χρειάζεται, μπορεί να γίνει υποκαλλιέργεια του απομονωμένου στελέχους σε τρυβλίο με άγαρ δεξτρόζης Sabouraud και επώασή του μέχρι να υπάρξει επαρκής ανάπτυξη. Συνιστάται επώαση για 48 ώρες σε θερμοκρασία 30 °C ή για 48 έως 72 ώρες σε θερμοκρασία 25 °C (θερμοκρασία δωματίου).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Καλλιέργειες επωασμένες για διάστημα άνω των 48 ωρών σε θερμοκρασία 30 °C θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο εάν απαιτείται επιπλέον επώαση για τη λήψη επαρκούς ανάπτυξης.

2. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλεό ή κρικοφόρο στείλεό ενοφθαλμισμού, αφαιρέστε την ανάπτυξη από το τρυβλίο άγαρ και παρασκευάστε γαλάκτωμα σε 3 mL ύδατος ενοφθαλμίσματος (απιονισμένο νερό αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο, σε σωληνάριο 13 x 84 mm ή 13 x 100 mm). Κάθε εναιώρημα πρέπει να συγκριθεί και να είναι σύμφωνο με το πρότυπο θολερότητας για ζυμομύκητες της MicroScan. Για τη σύγκριση μεταξύ του εναιωρήματος ενοφθαλμίσματος της εξέτασης και του προτύπου θολερότητας για ζυμομύκητες πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη πηγή φωτός και τα σωληνάρια πρέπει να συγκριθούν σε λευκή κάρτα με μαύρες γραμμές για τη δημιουργία αντίθεσης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Διασφαλίστε ότι δεν αφαιρείται θρεπτικό υλικό άγαρ μαζί με τον μικροοργανισμό.

3. Αναμίξτε ή περιδινήστε το εναιώρημα μέχρι να ομογενοποιηθεί. Ορισμένα στελέχη ζυμομυκήτων δεν διαλύονται εύκολα στο νερό. Εάν δεν προκύψει ομοιογενές εναιώρημα μετά την περιδίνηση, αφήστε το εναιώρημα σε ηρεμία για 10–15 λεπτά και περιδινήστε ξανά. Εάν υπάρχουν ακόμη συστάδες στο εναιώρημα, αφήστε τις συστάδες να κατακαθίσουν στον πυθμένα του σωληναρίου και χρησιμοποιήστε το υπερκείμενο διάλυμα για τον ενοφθαλμισμό της πλάκας ζυμομυκήτων. Η θολερότητα του υπερκείμενου διαλύματος πρέπει να συμφωνεί με το πρότυπο θολερότητας για ζυμομύκητες της MicroScan. Εάν δεν υπάρχει συμφωνία, μεταφέρετε περισσότερη ανάπτυξη στο ύδωρ ενοφθαλμίσματος και επαναλάβετε την παραπάνω διαδικασία.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΜΗ μεταφέρετε συστάδες κυττάρων στην πλάκα ζυμομυκήτων.

Ενοφθαλμισμός πλάκας

1. Επιστημάνετε την πλάκα με τον αριθμό δείγματος.
2. Προσθέστε 50 µL εναιωρήματος ζυμομύκητα σε κάθε βοθρίο που περιέχει υπόστρωμα και στα βοθρία ελέγχου BNAC και NPC. Δεν συνιστάται η χρήση πιπέτας Pasteur για ενοφθαλμισμό.

Πίνακας 1-1, Υποστρώματα

Υποστρώματα	Συντμ.	Υποστρώματα	Συντμ.
Υδροξυπρολίνη-β-ναφθυλαμίνη	HPR	L-ιστιδίνη-β-ναφθυλαμίνη	HIS
L-ισολευκίνη-β-ναφθυλαμίνη	ILE	Σακχαρόζη	SUC1
L-προλίνη-β-ναφθυλαμίνη	PRO	Σακχαρόζη	SUC2 ¹
L-τυροσίνη-β-ναφθυλαμίνη	TYR	Τρεχαλόζη	TRE

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Υποστρώματα	Συντμ.	Υποστρώματα	Συντμ.
β-ναφθυλαμίνη γλυκίνης	GLY	p-νιτροφαινυλο-α-D-γλυκοπυρανοζίτης	AGL1
Γλυκυλογλυκίνη-β-ναφθυλαμίνη	GGLY	p-νιτροφαινυλο-α-D-γλυκοπυρανοζίτης	AGL2 ¹
Γλυκυλ-L-αργινίνη-4-μεθοξυ-β-ναφθυλαμίνη	GLAR	p-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης	BGL
Γλυκυλ-L-προλίνη-4-μεθοξυ-β-ναφθυλαμίνη	GLPR	o-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης	BGAL
L-αργινυλο-L-αργινίνη-β-ναφθυλαμίνη	AARG	p-νιτροφαινυλο-β-D-φουκο-πυρανοζίτης	BDF
L-λυσύλ-L-αλανίνη-4-μεθοξυ-β-ναφθυλαμίνη	LYAL	p-νιτροφαινυλο-α-D-γαλακτοπυρανοζίτης	AGAL
L-αλανίνη-4-μεθοξυ-β-ναφθυλαμίνη	ALA	p-νιτροφαινυλο-N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμίνη	NAG
L-σερυλο-L-τυροσίνη-β-ναφθυλαμίνη	STY	p-νιτροφαινυλο-β-D-κυτταροβιόζη	CELL
Ουρία	URE	p-νιτροφαινυλο-N-ακετυλο-β-D-γαλακτοσαμινίδη	NGAL
Φωσφορικό 3-ινδοξύλιο	IDX		

1. Χρησιμοποιούνται διαφορετικές συνθέσεις των ίδιων υποστρωμάτων.

- Μετά τον ενοφθαλμισμό της πλάκας με το ενοφθάλμισμα 50 μL, χτυπήστε ελαφρώς κάθε πλευρά της πλάκας για να διασφαλιστεί η ανάμειξη με το υπόστρωμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αν η ανάλυση της πλάκας πρόκειται να γίνει στο σύστημα WalkAway ή autoSCAN-4, πρέπει να ενοφθαλμιστεί επίσης το βοηθίο LOC.

Επώαση

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

Ανάγνωση των πλακών

- 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.
- Για την ανάγνωση των πλακών, χρησιμοποιήστε αντανακλώμενο φως από λευκό υπόβαθρο.
- Μετά από επώαση για 4 ώρες, προσθέστε τα αντιδραστήρια πεπτιδάσης και υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) στα κατάλληλα βοηθία.

- Προσθέστε **1 σταγόνα** αντιδραστήριου πεπτιδάσης στα βοηθία BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY και HIS. Αφήστε το χρώμα να αναπτυχθεί για 30 δευτερόλεπτα, προτού καταγράψετε τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα πρέπει να καταγράφονται εντός 3 λεπτών από την προσθήκη του αντιδραστήριου. Η παρουσία ΟΠΟΙΑΣΔΗΠΟΤΕ ροζ ή κόκκινης απόχρωσης στο διάλυμα, είτε σε ολόκληρο το βοηθίο είτε σε οποιοδήποτε τμήμα του βοηθίου, ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα. Τα χρώματα πρέπει να συγκριθούν με το βοηθίο BNAC. Ορισμένα βοηθία μπορεί να έχουν πιο σκούρο πορτοκαλί χρώμα σε σχέση με το βοηθίο BNAC. Τα βοηθία αυτά θα πρέπει να καταγράφονται ως αρνητικά. Οι αντιδράσεις είναι θετικές μόνο εάν υπάρχει ροζ ή κόκκινη απόχρωση στο διάλυμα. Το χρώμα στα βοηθία αυτά θα σκουρύνει με την πάροδο του χρόνου. Το αρνητικό κίτρινο χρώμα μπορεί να γίνει πιο σκούρο πορτοκαλί. Αυτό πρέπει να ερμηνευτεί ως αρνητική αντίδραση.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μετά την προσθήκη πεπτιδάσης στο βοηθίο BNAC, θα πρέπει να ληφθεί κίτρινο χρώμα. Σε περίπτωση παρουσίας ροζ ή κόκκινου χρώματος, το αντιδραστήριο πεπτιδάσης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί.

- Προσθέστε **1 σταγόνα** αντιδραστήριου NaOH 0,05 N στα βοηθία AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL και NGAL. Περιμένετε 5 δευτερόλεπτα τουλάχιστον, αλλά όχι πάνω από 5 λεπτά, προτού καταγράψετε τα αποτελέσματα. Οποιαδήποτε απόχρωση του κίτρινου θα πρέπει να καταγραφεί ως θετική. Συγκρίνετε τα βοηθία που περιέχουν υπόστρωμα με το βοηθίο NPC.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα βοηθία αυτά μπορεί να έχουν πιο σκουρόχρωμη εμφάνιση από το βοηθίο NPC. Αυτό θα πρέπει να ερμηνευτεί ως αρνητική αντίδραση. Για να θεωρηθεί θετική η αντίδραση, απαιτείται η παρουσία κίτρινου χρώματος.

- Παρέχονται δύο βοηθία ελέγχου για βοήθεια στην ερμηνεία των αντιδράσεων.
 - BNAC = μάρτυρας β-ναφθυλαμίνης. Μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου πεπτιδάσης, αυτό το βοηθίο θα αποκτήσει κίτρινο χρώμα.
 - NPC = μάρτυρας νιτροφαινυλίου. Αυτό το βοηθίο θα πρέπει να είναι άχρωμο.
- Ανατρέξτε στην ενότητα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ για βοήθεια στη βιοχημική ερμηνεία.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το σύστημα WalkAway αναλύει τα βοηθία για τα οποία δεν απαιτείται πρώτα η χρήση αντιδραστηρίων, ώστε να προληφθεί η αλλοίωση των αποτελεσμάτων λόγω πιθανών παγιδευμένων αναθυμιάσεων από τα αντιδραστήρια κάτω από το καπάκι του δίσκου. Επομένως, οι βιοχημικές αντιδράσεις δεν είναι δυνατόν να επαληθευτούν μη αυτόματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ερμηνείες των υποστρωμάτων

Βύθισμα	Αντιδραστήριο	Θετικό	Αρνητικό
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστηρίου πεπτιδάσης. Αφήστε τη χρωματική αντίδραση να αναπτυχθεί για 30 δευτερόλεπτα τουλάχιστον, αλλά όχι πάνω από 3 λεπτά.	Οποιαδήποτε ροζ, κόκκινη έως πορφυρή απόχρωση στο διάλυμα ¹	Κίτρινο προς πορτοκαλί
SUC1 SUC2 TRE		Οποιαδήποτε απόχρωση του καφέ ή του κίτρινου	Πορφυρό
AGL1 BGL BGAL	Συγκρίνετε με το βοηθίο ελέγχου NPC.	Οποιαδήποτε απόχρωση του κίτρινου ²	Διαυγές
URE		Ροζ έως πορφυρή απόχρωση	Διαυγές/Μπεζ έως κίτρινο
IDX		Οποιαδήποτε απόχρωση του μπλε	Διαυγές
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστηρίου NaOH 0,05 N. Περιμένετε 5 δευτερόλεπτα τουλάχιστον, αλλά όχι πάνω από 5 λεπτά, προτού καταγράψετε το αποτέλεσμα. Συγκρίνετε με το βοηθίο ελέγχου NPC.	Οποιαδήποτε απόχρωση του κίτρινου ²	Διαυγές

1. Η παρουσία θετικού χρώματος ενδέχεται να μην εκτείνεται σε ολόκληρο το βοηθίο.

2. Με κάποιους ζυμομύκητες μπορεί να υπάρξει παρουσία ροζ χρώματος. Αυτό πρέπει να θεωρηθεί θετική αντίδραση.

ΑΡΧΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Υποστρώματα β-ναφθυλαμίνης αμινοξέων (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - Όταν το υπόστρωμα υδρολύεται από το κατάλληλο ένζυμο (συνήθως από αρυλαμιδάση αμινοξέων), απελευθερώνεται β-ναφθυλαμίνη. Η β-ναφθυλαμίνη ανιχνεύεται μέσω της προσθήκης p-διμεθυλαμινοκινναμυλδεΰδης (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 δύνανται 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.

Υδατάνθρακες (SUC1, SUC2, TRE) - Η χρησιμοποίηση της σακχαρόζης και της τρεχαλόζης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH, επιφέροντας αλλαγή του κόκκινου της χλωροφαινόλης από μοβ σε κίτρινο χρώμα. Αυτές οι αντιδράσεις υδατανθράκων είναι επιλεκτικές και ενδέχεται να μη συμβαδίζουν με τις συμβατικές αντιδράσεις.

Υποστρώματα νιτροφαινυλίου (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - Εάν είναι παρόν το κατάλληλο ένζυμο, το υπόστρωμα διασπάται, απελευθερώνοντας ορθο-νιτροφαινόλη ή παρα-νιτροφαινόλη. Σε αλκαλικό pH, οι ενώσεις αυτές έχουν κίτρινο χρώμα. Εάν η αντίδραση λάβει χώρα σε όξινο pH, απαιτείται προσθήκη NaOH μετά την

επώαση, πριν την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Τα βοηθία μπορεί να είναι άχρωμα ή να έχουν ωχροκίτρινη χροιά πριν από την προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου.

Φωσφατάση ινδοξυλίου (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-γκρίζου ιζήματος.

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 κόκκινου της φαινόλης από κίτρινο σε κόκκινο χρώμα.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Το Βιβλίο κωδικοποίησης βιοτύπων ζυμομυκήτων ταχείας ταυτοποίησης της MicroScan χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των άγνωστων μικροοργανισμών της εξέτασης. Το βιβλίο κωδικοποίησης έχει δημιουργηθεί από τη βάση δεδομένων της MicroScan για τις εξετάσεις που περιλαμβάνονται στην πλάκα ταυτοποίησης. Το Βιβλίο κωδικοποίησης ζυμομυκήτων βασίζεται σε υπολογιστική ανάλυση των 27 εξετάσεων της πλάκας ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων μετασχηματίζονται σε έναν 9ψήφιο 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 συνολικό αθροιστικό ποσοστό 99,9%.

Εάν προκύψει αριθμός βιοτύπου που δεν περιέχεται στο βιβλίο κωδικοποίησης, θα πρέπει αρχικά να εξεταστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης σφάλματος στη διαδικασία. Για παράδειγμα, ενδεχομένως ο αριθμός βιοτύπου να προστέθηκε εσφαλμένα ή να καταγράφηκε 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 πλάκες ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων έχουν σχεδιαστεί για την ταυτοποίηση ζυμομυκήτων και μικροοργανισμών που προσομοιάζουν με ζυμομύκητες (π.χ. *Prototheca*). Απαιτείται προσοχή με μικροοργανισμούς που παράγουν υπερβολική υφή.
2. Εάν είναι προγραμματισμένη η ταυτοποίηση περισσότερων τους ενός ειδών για έναν συγκεκριμένο αριθμό βιοτύπου, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διενέργεια συμπληρωματικών εξετάσεων. Στις αποδεκτές διαδικασίες ταυτοποίησης ζυμομυκήτων και μικροοργανισμών που προσομοιάζουν με ζυμομύκητες περιλαμβάνεται η μορφολογία αποικιών, η ανάπτυξη σε αυξημένη θερμοκρασία, ο σχηματισμός χρωστικής και το χρώμα σε άγαρ φαινολοξειδάσης. Η μικροσκοπική μορφολογία επί θρεπτικών υλικών που έχουν σχεδιαστεί για τη λήψη της τυπικής μορφολογίας μπορεί επίσης να συμβάλει στην ανίχνευση αυτών των μικροοργανισμών. Ανατρέξτε στις κατάλληλες μυκητολογικές διαδικασίες αναφοράς.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Μπορεί να υπάρξει απόκλιση στα αποτελέσματα των χρωμογονικών εξετάσεων λόγω υπερβολικά αυξημένου ή μειωμένου ενοφθαλμισμού του συστήματος. Κάθε ενοφθαλμίσμα πρέπει να συγκρίνεται με το πρότυπο θολερότητας για την επίτευξη της σωστής συγκέντρωσης ενοφθαλμίσματος για τη βέλτιστη απόδοση.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η αποδεκτότητα των υποστρωμάτων ταυτοποίησης θα πρέπει να ελέγχεται μέσω της εξέτασης μικροοργανισμών με γνωστές αντιδράσεις. Τα αποτελέσματα κάθε αντίδρασης για τους μικροοργανισμούς ελέγχου που συνιστώνται από την MicroScan παρέχονται στον πίνακα ποιοτικού ελέγχου του παρόντος εγχειριδίου.

Πίνακας ποιοτικού ελέγχου υποστρωμάτων ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
ILE ²	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓
PRO	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
TYR	✓	✓	+	✓	-	✓	✓
GLY	✓	-	+	✓	✓	✓	✓
GGLY	✓	✓	+	✓	-	✓	✓
GLAR	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
GLPR ³	✓	✓	+	✓	✓	✓	✓
AARG	-	✓	✓	+	✓	✓	✓
LYAL	-	✓	✓	✓	✓	✓	+
ALA	✓	✓	✓	✓	-	+	✓
STY	-	✓	✓	✓	✓	✓	+
URE	-	✓	✓	✓	+	✓	✓
IDX	✓	✓	+ ⁴	✓	-	✓	✓
HIS	✓	✓	✓	✓	-	+	✓
SUC1	-	+	✓	✓	✓	✓	✓

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Οι σκιασμένες προδιαγραφές ΠΕ στον παραπάνω πίνακα θα εφαρμοστούν στις εκδόσεις λογισμικού LabPro ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Θετικό αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί με το *Rhodoturulula rubra*, ATCC 66034.
3. Αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί με το *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Ενδέχεται να απαιτείται οπτική επαλήθευση των μετρήσεων του οργάνου.
5. Θετικό αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί με το *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Σημείωση: Οι μικροοργανισμοί ποιοτικού ελέγχου είναι επιλεγμένοι έτσι ώστε να παρέχουν θετικές/αρνητικές αντιδράσεις για όλα τα υποστρώματα ταυτοποίησης. Κατά συνέπεια, οι ταυτοποιημένοι μικροοργανισμοί ενδέχεται να διαφέρουν από τους μικροοργανισμούς που παρατίθενται στον πίνακα ΠΕ. Η αποδεκτότητα της απόδοσης του προϊόντος πρέπει να προσδιορίζεται μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων των εξετάσεων και όχι βάσει της ταυτοποίησης.

ΔΗΛΩΣΗ ΕΓΓΥΗΣΗΣ

Το σύστημα καλύπτεται από και υπόκειται στις διατάξεις της εγγύησης που περιλαμβάνεται στη συμβατική συμφωνία σας για το σύστημα ή τα αντιδραστήριά του. Ο πελάτης είναι υπεύθυνος για διαδικασίες προληπτικής συντήρησης ρουτίνας. Οι επισκευές που οφείλονται στην αδυναμία πραγματοποίησης αυτών των διαδικασιών συντήρησης στα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνται κατά την κρίση της Beckman Coulter και με χρέωση του πελάτη.

Υπόμνημα συμβόλων

Υπόμνημα συμβόλων			
Σύμβολο	Τίτλος συμβόλου	Περιγραφή προτύπου	Πρότυπο
	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
	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/EOK, 93/42/EOK και 98/79/EK 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

Υπόμνημα συμβόλων			
Σύμβολο	Τίτλος συμβόλου	Περιγραφή προτύπου	Πρότυπο
	Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις	Υποδεικνύει τον συνολικό αριθμό εξετάσεων IVD που μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη συσκευή IVD. (Περιλαμβάνεται συνήθως στα κιτ αντιδραστηρίων.)	ISO 15223-1; 5.5.5
	In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή	Υποδεικνύει μια ιατρική συσκευή που προορίζεται για χρήση ως ιατρική συσκευή για διάγνωση in vitro.	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 ασφαλείας.	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
	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

酵母菌快速鉴定操作手册

REF B1017-70

预期用途

酵母菌快速鉴定检测板设计用于快速鉴定从临床标本分离的酵母菌和酵母样微生物。

摘要和原理

使用经过改良的常规显色测试鉴定从临床标本中分离的酵母菌。酵母菌快速鉴定检测板是一款使用 27 种脱水底物的 96 孔微量稀释检测板（参见表 1-1）。将使用酵母菌和高压灭菌水混合而成的重悬液来再水化底物。在 35-37°C 下将检测板培养 4 小时后可获得鉴定结果。

警告和注意事项

1. 酵母菌快速鉴定检测板仅用于体外诊断。
2. 不要让肽酶试剂或氢氧化钠试剂或者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，请使用无菌技术并遵循既定的微生物危害预防措施，同时注意已接种的检测板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

将检测板和肽酶试剂储存在 2-8°C 环境下。

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

请参考美国微生物学会 Manual of Clinical Microbiology（临床微生物手册）¹或其他真菌学参考手册，了解运输和分离酵母菌的建议程序。快速显色检测基于未知微生物中含有预成酶。^{2,3,4} 因此，由于不同培养基对不同酶的还原作用，微生物生长的平板培养基将影响检测结果。酵母菌快速鉴定检测板基于使用沙氏葡萄糖琼脂（标准液或 Emmons 改良）。生长培养基中存在的抗生素不是一个重要变量，但不应使用含血、酵母萃取物-麦芽萃取物 (YM) 琼脂和霉菌抑制琼脂 (IMA) 的培养基。

提供的材料

酵母菌快速鉴定检测板 (B1017-70)

工作表

操作手册

质控表

所需但未提供的材料

接种液 (B1015-2)

0.05 N 氢氧化钠 (B1015-3)

肽酶试剂 (B1012-30B)

酵母菌浊度检测标准液 (B1015-18)

盖盘 (B1010-56B)

MicroScan 酵母菌生物型代码本 (B1014-1A)

接种环

沙氏葡萄糖琼脂板

旋涡振荡器

50 µL 移液器及吸头

孵育盘 (35-37°C)，无 CO₂

质量控制微生物：

Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

操作步骤
检测板的制备

1. 从储存处取出要用的检测板。**如果发现干燥剂包丢失或包装破损，或者检测板包装不完整（未密封、被刺破或撕破），请勿使用该检测板。**
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. 用生长活跃的微生物接种酵母菌快速鉴定检测板。如果生长足够，可以使用原代分离沙氏葡萄糖琼脂板中的菌落。必要时，将酵母分离株放在沙氏葡萄糖琼脂板上传代培养，并培养到生长足够时。建议在 30°C 下培养 48 小时，或在 25°C（室温）下培养 48 到 72 小时。
注释：只应在需要额外培养以获取足够生长时使用在 30°C 下培养超过 48 小时的培养液。
2. 用无菌棉拭子或接种环从琼脂板上取生长的微生物，然后放到 3 mL 接种液（13 x 84 mm 或 13 x 100 mm 试管中的高压灭菌去离子水）中乳化。必须比较每种悬液，确认其等效于 MicroScan 酵母菌浊度检测标准液。在比较检测接种悬液和酵母菌浊度检测标准液时，应在充足的光源下，将试管和带有对比黑线的白色卡片进行比较。
注释：需注意确保不要将琼脂培养基与微生物一同取下。
3. 手动或使用漩涡振荡器将悬液混合直至均匀。有些酵母菌株不容易分散到水中。如果使用漩涡振荡器不能产生均匀的悬液，将悬液静置 10-15 分钟并再次混匀。如果悬液中仍有团块，让团块沉淀到试管底部并使用上清液接种酵母菌检测板。上清液的浊度必须与 MicroScan 酵母菌浊度检测标准液一致。如果不一致，则转移更多生长液到接种液中并重复上述程序。
注释：不要将细胞团块移液至酵母菌检测板中。

检测板接种

1. 用标本编号标记检测板。
2. 将 50 µL 酵母菌悬液加入每个含底物的孔以及对照孔 BNAC 和 NPC 中。不建议使用巴斯德吸管接种。

表 1-1，底物

底物	缩写	底物	缩写
羟脯氨酸-β-萘酰胺	HPR	L-组氨酸-β-萘酰胺	HIS
L-异亮氨酸-β-萘酰胺	ILE	蔗糖	SUC1
L-脯氨酸-β-萘酰胺	PRO	蔗糖	SUC2 ¹
L-酪氨酸-β-萘酰胺	TYR	海藻糖	TRE
甘氨酸-β-萘酰胺	GLY	p-硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷	AGL1
双甘氨酸-β-萘酰胺	GGLY	p-硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷	AGL2 ¹
甘氨酸-L-精氨酸-4-甲氧基-β-萘酰胺	GLAR	p-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷	BGL
甘氨酸-L-脯氨酸-4-甲氧基-β-萘酰胺	GLPR	o-硝基苯基-β-D-半乳糖苷	BGAL
L-精氨酸-L-精氨酸-β-萘酰胺	AARG	p-硝基苯基-β-D-岩藻糖苷	BDF
L-赖氨酸-L-丙氨酸-4-甲氧基-β-萘酰胺	LYAL	p-硝基苯基-α-D-半乳糖苷	AGAL
L-丙氨酸-4-甲氧基-β-萘酰胺	ALA	p-硝基苯基-N-乙酰-β-D-葡萄糖胺	NAG
L-丝氨酸-L-酪氨酸-β-萘酰胺	STY	p-硝基苯基-β-D-纤维二糖	CELL
脲	URE	p-硝基苯基-N-乙酰-β-D-氨基半乳糖苷	NGAL
3-吡啶磷酸盐	IDX		

1. 使用同一底物的不同配方。
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。
注释：如果通过 WalkAway 或 autoSCAN-4 读取检测板，还必须接种 LOC 孔。

孵育

1. 以 3-5 个为一组叠放检测板，将盖盘置于顶部检测板的上面以防蒸发。

*美国标准菌种保藏中心，地址：Manassas, VA USA

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

- 在读取检测板前，至少提前 30 分钟将肽酶试剂从冰箱中取出。肽酶试剂可能在 4°C 下沉淀，但会在室温下再溶解。不要试图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。
- 使用来自白色背景的反射光读取检测板。
- 培养 4 小时后，将肽酶试剂和氢氧化钠 (NaOH) 试剂加入适当的孔中。

A. 将 **1 滴**肽酶试剂加入 BNAC、HPR、ILE、PRO、TYR、GLY、GGLY、GLAR、GLPR、AARG、LYAL、ALA、STY 以及 HIS 孔中。等待 30 秒，出现显色后记录结果。必须在加入试剂后的 3 分钟内记录结果。如果整个孔或任何一部分孔中的溶液出现任何程度的粉色或红色，则判读为阳性。应将颜色与 BNAC 孔相比较。有些孔可能会呈现比 BNAC 孔更深的橙色，这些结果应记录为阴性。只有当溶液呈现粉色或红色时，反应才为阳性。这些孔的颜色将随着时间加深，阴性的黄色可能会成为更深的橙色，此结果应判读为阴性反应。

注释：将肽酶加入 BNAC 孔后，应呈现黄色。如果出现任何粉色或红色，则不应使用该肽酶试剂。

B. 将 **1 滴** 0.05 N NaOH 加入 AGL2、BDF、AGAL、NPC、NAG、CELL 以及 NGAL 孔。至少等待 5 秒但不超过 5 分钟，然后记录结果。出现各种程序的黄色时，均应将反应结果记录为阳性。将含底物的孔与 NPC 孔进行比较。

注释：这些孔的颜色可能比 NPC 孔更深。此结果应判读为阴性，但黄色必须视为阳性。

4. 提供两个对照孔帮助判读反应。

A. BNAC = β-萘酰胺对照。加入肽酶试剂后，这个孔将呈现黄色。

B. NPC = 硝基苯基对照。这个孔应该没有颜色。

5. 请参考“结果”部分，了解对结果的生物化学判读。

注释：WalkAway 首先读取不需要试剂的孔，以防可能积聚在托盘盖下的试剂烟雾造成结果改变。因此，无法手动验证生化反应。

**结果
底物判读**

Well	试剂	阳性	阴性
HPR	加入 1 滴肽酶试剂。至少等待 30 秒但不超过 3 分钟，让颜色反应显色。	溶液中有任何程度的粉色、红色到品红 ¹	黄色到橙色
ILE			
PRO			
TYR			
GLY			
GGLY			
GLAR			
GLPR			
AARG			
LYAL			
ALA			
STY			
HIS			
SUC1	与 NPC 对照孔比较。	任何程度的棕色或黄色	紫色
SUC2			
TRE			
AGL1	加入 1 滴 0.05 N NaOH。至少等待 5 秒但不超过 5 分钟，然后记录结果。与 NPC 对照孔比较。	任何程度的黄色 ²	透明
BGL			
BGAL			
URE		粉色到品红	清澈/米黄到黄色
IDX			
AGL2		任何程度的蓝色	透明
BDF			
AGAL			
NAG			
CELL			
NGAL			

1. 阳性颜色可能不会漫布整个孔。
2. 有些酵母菌可能会呈现粉色。这应视为阳性反应。

鉴定反应原理

氨基酸 β-萘酰胺底物 (HPR、ILE、PRO、TYR、GLY、GGLY、GLAR、GLPR、AARG、LYAL、ALA、STY、HIS) — 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) 加入能形成粉色到紫色化合物的对二甲氨基苯甲醛来检测 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，检测板不一定能检测出各种不同的酶。一种芳基酰胺酶可以水解多种氨基酸 β-萘酰胺。

糖类 (SUC1、SUC2、TRE) — 利用蔗糖和海藻糖会使 pH 值下降，从而导致氯酚红从紫色变成黄色。这些糖类反应具有选择性，可能不符合常规反应。

硝基苯基底物 (AGL1、BGL、BGAL、AGL2、BDF、AGAL、NAG、CELL、NGAL) — 如果存在适当的酶，底物会分裂释放出邻硝基酚或对硝基酚。在碱性 pH 值下，这些化合物呈现黄色。如果在酸性 pH 值下发生反应，必须在培养后添加 NaOH，然后再读取结果。加入氢氧化钠前，孔可能呈现出无色或淡黄色。

吲哚磷酸酶 (IDX) — 磷酸酶分裂吲羟磷酸盐释放出吲哚酚。吲哚酚与氧气结合形成不能溶解的蓝色或蓝灰色沉淀物 — 靛青。

尿素 (URE) — 尿素酶分解尿素形成氨和二氧化碳。氨 (以碳酸铵的形式存在) 可以导致 pH 值升高，这可以通过酚红从黄色变为红色来检测。

微生物鉴定

MicroScan Rapid Yeast Biotype Codebook (MicroScan 酵母菌快速检测生物型代码本) 用于鉴定未知检测微生物。该代码本根据鉴定检测板上所执行检测的 MicroScan 数据库生成。酵母菌代码本根据酵母菌快速鉴定检测板上执行的 27 项检测的计算机分析编制。这些检测结果被转换为 9 位数的生物型码，代码本据此列出菌属鉴定及鉴定的累积相对概率。所有可能的鉴定结果按由高到低的顺序列出，最高为 99.9% 的累积总概率。

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；例如，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检测微生物，特别要注意使用足够浑浊的细胞悬液。如果重新检测后产生的结果相同，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. 酵母菌快速鉴定检测板设计用于鉴定酵母菌和酵母样微生物 (如原壁菌属)。必须注意产生过量菌丝的微生物。
- 2. 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。酵母菌和酵母菌样微生物的可接受鉴定程序包括菌落形态、高温下生长、色素形成及化酵素琼脂上的显色。用显微镜观察培养基上的形态旨在得出典型的形态，也可以帮助鉴定这些微生物。请参阅合适的真菌学参考程序。^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
- 3. 由于系统过量接种或接种不足，可能会导致显色结果变化。必须将每种接种物与浊度检测标准液进行比较，以获得正确的接种物浓度，从而达到最佳性能。

质量控制

应当通过测试具有已知反应的微生物来检查鉴定底物的可接受性。推荐的 MicroScan 对照微生物的每种反应结果在该手册的质控表中提供。

酵母菌快速鉴定底物质控表

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	√	√	√	-	√	√
ILE ²	√	√	√	√	-	√	√
PRO	+	√	√	√	-	√	√
TYR	√	√	+	√	-	√	√
GLY	√	-	+	√	√	√	√
GGLY	√	√	+	√	-	√	√
GLAR	+	√	√	√	-	√	√
GLPR ³	√	√	+	√	√	√	√
AARG	-	√	√	+	√	√	√
LYAL	-	√	√	√	√	√	+
ALA	√	√	√	√	-	+	√
STY	-	√	√	√	√	√	+
URE	-	√	√	√	+	√	√
IDX	√	√	+	√	-	√	√
HIS	√	√	√	√	-	+	√
SUC1	-	+	√	√	√	√	√
SUC2	-	+	√	√	√	√	√
TRE	-	√	√	√	√	+	√
AGL1	-	√	+	√	√	√	√
BGL	-	+	√	√	√	√	√
BGAL	-	+	√	√	√	√	√

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
AGL2	√	-	√	+	√	√	√
BDF	-	+	√	√	√	√	√
AGAL ⁵	-	√	√	√	√	√	√
NAG	√	-	√	√	+	√	√
CELL	-	√	√	+	√	√	√
NGAL	+	-	√	√	√	√	√

以上表格中加阴影的质控规格将在 ≥ 1.90 版本的 LabPro 软件中实现。

1. 美国标准菌种保藏中心，地址：Manassas, VA USA

2. *Rhodotorula rubra* ATCC 66034 可能获得阳性结果。

3. *Candida lusitanae* ATCC 66035 可能获得阴性结果。

4. 仪器读数可能需要目视验证。

5. *Cryptococcus laurentii* ATCC 66036 可能获得阳性结果。

注释：所选质量控制微生物应能为所有鉴定底物提供阳性/阴性反应。因此，微生物鉴定可能会与质控表中列出的不同。产品性能的可接受性应根据比较检测结果而非鉴定结果确定。

保修声明

本系统受本系统及其试剂的合约协议中明定的保修条款保护和约束。客户负责执行例行的预防性保养程序。因未按指定时间间隔执行这些保养程序而导致的维修将由贝克曼库尔特公司酌情处置，相关费用由客户承担。

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
	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
	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
	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
	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
	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 标志	欧盟 CE 认证法规标志	不适用
	内置物	不适用	不适用
	内容物（包装）	抗菌剂（缩写）	不适用
	内容物（包装）	鉴定底物（缩写）	不适用
	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“

Greitųjų mielių indentifikavimo plokštelių procedūrų vadovas

REF B1017-70

PASKIRTIS

Greitoji mielių grybelių indentifikavimo plokštelė skirta mielių grybeliams ir mielių grybelių tipo rūšims, išskirtoms iš klinikinių mėginių, skubiai indentifikuoti.

SUVESTINĖ IR PRINCIPAS

Chromogeniniai ir modifikuoti įprastiniai tyrimai naudojami mielių grybelių rūšims, išskirtoms iš klinikinių mėginių, indentifikuoti. Greitoji mielių grybelių indentifikavimo plokštelė – tai 96 šulinėlių mikroskiedimo plokštelė, kurioje naudojami 27 dehidratuoti substratai (žr. 1-1 lentelę). Sunki mielių grybelių suspensija autoklavu apdorotame vandenyje naudojama substratams rehidratuoti. Identifikacija nustatoma po plokštelės 4 valandų inkubacijos 35–37 °C temperatūroje.

ISPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Greitosios mielių grybelių indentifikavimo plokštelės tik *in vitro* diagnostiniam naudojimui.
2. Saugokitės, kad į akis, ant odos ar ant drabužių nepatektų peptidazės arba natrio hidroksido reagento ar bet kurio indentifikavimo substrato.
3. Atlikdami visas procedūras taikykite aseptines technikas ir nustatytas atsargumo priemones dėl mikrobiologinių pavojų, nepamirškite, kad inokuliuotose plokštelėse gali būti galimai patogeninių mikroorganizmų.
4. Visos medžiagos prieš šalinamos turi būti apdorotos autoklave.

LAIKYMAS

Plokštelės ir peptidazės reagentą laikykite 2–8 °C temperatūroje.

VISUOTINAI SUDERINTOS SISTEMOS (GHS) PAVOJINGUMO KLASIFIKACIJA

Neklasifikuojama kaip pavojinga

SDS

Saugos duomenų lapą galima gauti interneto svetainėje techdocs.beckmancoulter.com

MĖGINIO PAĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Rekomenduojamas mielių grybelių transportavimo ir išskyrimo procedūras žr. Amerikos mikrobiologijos draugijos leidinyje „Manual of Clinical Microbiology“ (Klinikinės mikrobiologijos vadovas)¹ arba kituose mikrobiologijos žinyuose. Skubūs chromogeniniai tyrimai pagrįsti iš anksto sudarytų fermentų buvimu nežinomame mikroorganizme.^{2, 3, 4} Taigi, plokštelių terpė, kurioje auginamas mikroorganizmas, paveikia tyrimo rezultatus, nes skirtingos terpės sužadina skirtingus fermentus. Greitosios mielių grybelių indentifikavimo plokštelės pagrindas yra Sabouraud dekstrozės agaras (standartinis ar Emmons modifikacija). Antibiotikų buvimas augimo terpėje nėra itin svarbus veiksnys, tačiau negalima naudoti terpės, kurioje yra kraujo, mielių ekstrakto-salyklo ekstrakto (YM) agaro ar slopinančio pelėsių agaro (IMA).

PATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

Greitosios mielių grybelių indentifikavimo plokštelės (B1017-70)

Darbo lapas

Procedūrų vadovas

Kokybės kontrolės lentelė

REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

Inokulianto vanduo (B1015-2)

0,05 N natrio hidroksidas (B1015-3)

Peptidazės reagentas (B1012-30B)

Mielių drumstumo standartas (B1015-18)

Dengiamieji dėklai (B1010-56B)

„MicroScan“ mielių grybelių biotipų kodų knygelė (B1014-1A)

Inokuliavimo kilpelės

Sabouraud dekstrozės agaro lėkštelės

Sūkurinis maišytuvas

50 µl automatinė pipetė su antgaliais

Inkubatorius (35–37 °C), ne CO₂

Kokybės kontrolės mikroorganizmai:

C29879–AB

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDŪRA

Plokščiųlių paruošimas

1. Išimkite naudojamą plokštelę iš saugyklos. **Plokščiųlių naudoti negalima, jei nėra džioviklio arba jis sulūžęs, arba jei pažeistas pakuotės vientisumas (pakuotė atidaryta, pradurta ar įplėšta).**
2. Perpjaukite maišelį ir išimkite plokštelę. Tuoj pat išimkite plokštelę iš folijos maišelio. Prieš rehidratuodami leiskite plokščiųlių temperatūrai susilyginti su kambario temperatūra. Plokštelės gali būti sudėtos viena ant kitos, su švari dengiamuoju dėklu ant viršaus.

Inokulianto paruošimas

1. Inokuliuokite greitąją mielių grybelių identifikavimo plokštelę aktyviai augančiu mikroorganizmu. Jei yra pakankamas augimas, galima naudoti kolonijas iš pirminio išskyrimo Sabouraud dekstrozės agarą lėkštelėje. Jei reikia, pasėkite išskirtą mielių grybelių padermę į Sabouraud dekstrozės agarą lėkštelę ir inkubuokite tol, kol vyks pakankamas augimas. Rekomenduojama inkubuoti 48 valandas 30 °C temperatūroje arba 48–72 valandas 25 °C (kambario) temperatūroje.

PASTABA: kultūras, kurios ilgiau nei 48 valandas inkubuotos 30 °C temperatūroje, galima naudoti tik tuo atveju, jei papildomas inkubavimas buvo reikalingas pakankamam augimui pasiekti.

2. Steriliu tamponu ar inokuliacijos kilpele paimkite pasėlį iš agarą lėkštelės ir padarykite emulsiją 3 ml inokulianto vandens (autoklavu apdorotas dejonizuotas vanduo 13 × 84 mm arba 13 × 100 mm mėgintuvėlyje). Kiekvieną suspensiją būtina palyginti ir ji turi atitikti „MicroScan“ mielių drumstumo standartą. Tiriamą inokulianto suspensiją ir mielių drumstumo standartą reikia palyginti naudojant tinkamą šviesos šaltinį ir lyginant mėgintuvėlius su balta kortele, kurioje nubrėžtos kontrastuojančios juodos linijos.

PASTABA: pasistenkite užtikrinti, kad su mikroorganizmu nebūtų paimta agarą terpės.

3. Įprastai ar sūkurinėje maišyklėje maišykite suspensiją tol, kol ji taps vienalytė. Kai kurios mielių grybelių padermės sunkiai disperguojamos vandenyje. Jei maišant sūkurinėje maišyklėje negaunama vienalytė suspensija, palikite suspensiją pastovėti 10–15 minučių, tada vėl maišykite sūkurine maišykle. Jei suspensijoje vis tiek yra gumulų, palaukite, kol gumulai nusės į mėgintuvėlio dugną, ir inokuliuokite mielių grybelių plokštelę paviršiniu suspensijos sluoksniu. Paviršinio sluoksnio drumstumas turi atitikti „MicroScan“ mielių drumstumo standartą. Jei drumstumas neatitinka, perkelti daugiau pasėlio į inokulianto vandenį ir pakartokite aprašytą procedūrą.

PASTABA: NEBANDYKITE pipete perkelti ląstelių gumulų į mielių grybelių plokštelę.

Plokščiųlių inokuliacija

1. Ant plokštelės užrašykite mėginio numerį.
2. Į kiekvieną šulinėlį su substratu ir į kontrolinius šulinėlius BNAC ir NPC įlašinkite po 50 µl mielių grybelių suspensijos. Inokuliuojant nerekomenduojama naudoti Pasteuro pipetės.

1-1 lentelė. Substratai

Substratai	Santr.	Substratai	Santr.
Hidroksiprolin-β-naftilamidas	HPR	L-histidin-β-naftilamidas	HIS
L-izoleucin-β-naftilamidas	ILE	Sacharozė	SUC1
L-prolin-β-naftilamidas	PRO	Sacharozė	SUC2 ¹
L-tirozin-β-naftilamidas	TYR	Trehalozė	TRE
Glicino β-naftilamidas	GLY	p-nitrofenil-α-D-gliukopiranozidas	AGL1
Glicilglicin-β-naftilamidas	GGLY	p-nitrofenil-α-D-gliukopiranozidas	AGL2 ¹
Glicil-L-arginin-4-metoksi-β-naftilamidas	GLAR	p-nitrofenil-β-D-gliukopiranozidas	BGL
Glicil-L-prolin-4-metoksi-β-naftilamidas	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozidas	BGAL
L-arginil-L-arginin-β-naftilamidas	AARG	p-nitrofenil-β-D-fukopiranozidas	BDF
L-lizil-L-alanin-4-metoksi-β-naftilamidas	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galaktopiranozidas	AGAL
L-alanin-4-metoksi-β-naftilamidas	ALA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-gliukozaminas	NAG
L-seril-L-tirozin-β-naftilamidas	STY	p-nitrofenil-β-D-celobiozė	CELL
Šlapalas	URE	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galaktozaminas	NGAL
3-indoksilfosfatas	IDX		

1. Naudojamos skirtingos tų pačių substratų formuliuotės.

*Amerikos kultūrų tipų kolekcija, Manasas, VA USA

3. Plokštelę inokuliuavę 50 µl inokulianto, švelniai patapšnokite kiekvieną plokštelės kraštą, kad inokuliantas lengviau susimaišytų su substratu.

PASTABA: jei plokštelė bus nuskaitoma prietaisu „WalkAway“ ar „autoSCAN-4“, taip pat reikia inokuliuoti LOC šulinėlį.

Inkubavimas

1. Sudėkite plokšteles grupėmis po 3–5 plokšteles su dengiamuoju dėklu ant viršutinės plokštelės, kad apsaugotumėte nuo garavimo.
2. Inokuliuotas plokšteles 4 valandas inkubuokite ne CO₂ inkubatoriuje, 35–37 °C temperatūroje.

Plokštelių nuskaitymas

1. Išimkite peptidazės reagentą iš šaldytuvo bent 30 minučių prieš nuskaitydami plokšteles. Peptidazės reagente 4 °C temperatūroje gali susidaryti nuosėdos, tačiau jos vėl ištirps kambario temperatūroje. Nelaikykite peptidazės reagento aukštesnėje temperatūroje mėgindami pagreitinti pakartotinį kristalinių nuosėdų ištirpimą, nes aukštoje temperatūroje reagentas skyla.
2. Plokšteles nuskaitykite naudodami nuo balto fono atspindėtą šviesą.
3. Inkubavę 4 valandas, į atitinkamus šulinėlius įlašinkite peptidazės ir natrio hidroksido (NaOH) reagentų.

A. Į BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY ir HIS šulinėlius įlašinkite po **1 lašą** peptidazės reagento. Prieš užrašydami rezultatus palaukite 30 sekundžių, kol atsiras spalva. Pridėjus reagento rezultatus reikia užrašyti ne vėliau kaip po 3 minučių. BET KOKIO rožinės ar raudonos spalvos atspalvio atsiradimas tirpale visame šulinėlyje ar bet kurioje šulinėlio dalyje laikomas teigiama reakcija. Spalvas reikia palyginti su BNAC šulinėliu. Kai kurie šulinėliai gali būti tamsesnės oranžinės spalvos nei BNAC šulinėlis. Juos reikia užrašyti kaip neigiamas reakcijas. Reakcijos teigiamos tik tada, jei tirpale yra rožinė ar raudona spalva. Laikui bėgant spalva šiuose šulinėliuose tamsėja. Neigiamos reakcijos geltona spalva gali pasikeisti į tamsesnę oranžinę spalvą. Tai reikia interpretuoti kaip neigiamą reakciją.

PASTABA: įlašinus peptidazės į BNAC šulinėlį, jis turi būti geltonas. Jei yra bet kokia rožinė ar raudona spalva, peptidazės reagento naudoti negalima.

B. Į AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL ir NGAL šulinėlius įlašinkite po **1 lašą** 0,05 N NaOH. Prieš užrašydami rezultatus palaukite bent 5 sekundes, tačiau ne ilgiau nei 5 minutes. Bet kokį geltonos spalvos atspalvį reikia užrašyti kaip teigiamą reakciją. Šulinėlius su substratu palyginkite su NPC šulinėliu.

PASTABA: šie šulinėliai gali būti tamsesni nei NPC šulinėlis. Tai reikia interpretuoti kaip neigiamą reakciją. Kad reakciją būtų galima laikyti teigiama, turi būti geltonos spalvos.

4. Kad būtų lengviau interpretuoti reakcijas, pateikti du kontroliniai šulinėliai.
 - A. BNAC = β-naftilamido kontrolinė medžiaga. Įlašinus peptidazės reagento šis šulinėlis bus geltonos spalvos.
 - B. NPC = nitrofenilo kontrolinė medžiaga. Šis šulinėlis turi būti bespalvis.
5. Jei reikia pagalbos atliekant biocheminį interpretavimą, žr. skyrių REZULTATAI.

PASTABA: „WalkAway“ pirmiausiai nuskaitytuosius šulinėlius, kuriems nereikia reagentų, kad rezultatai nepakistų dėl reagentų garų, galinčių likti po dėklo dangteliu. Dėl šios priežasties, biocheminių reakcijų negalima patikrinti rankiniu būdu.

REZULTATAI

Substrato interpretavimas

Well	Reagentas	Teigiamas	Neigiamas
HPR	Įlašinkite 1 lašą peptidazės reagento. Palaukite bent 30 sekundžių, bet ne ilgiau nei 3 minutes, kol įvyks spalvinė reakcija.	Bet koks rožinės, nuo raudonos iki rausvos spalvos atspalvis tirpale ¹	Nuo geltonos iki oranžinės
ILE			
PRO			
TYR			
GLY			
GGLY			
GLAR			
GLPR			
AARG			
LYAL			
ALA			
STY			
HIS			
SUC1		Bet koks rudos spalvos atspalvis arba geltona	Purpurinė
SUC2			
TRE			

Well	Reagentas	Teigiamas	Neigiamas
AGL1 BGL BGAL	Palyginkite su NPC kontroliniu šulinėliu.	Bet koks geltonos spalvos atspalvis ²	Skaidrus
URE		Nuo rožinės iki rausvos	Nuo skaidrios /smėlio spalvos iki geltonos
IDX		Bet koks mėlynos spalvos atspalvis	Skaidrus
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Ilašinkite 1 lašą 0,05 N NaOH. Prieš užrašydami rezultatą palaukite bent 5 sekundes, tačiau ne ilgiau nei 5 minutes. Palyginkite su NPC kontroliniu šulinėliu.	Bet koks geltonos spalvos atspalvis ²	Skaidrus

1. Teigiamos reakcijos spalva gali būti ne visame šulinėlyje.

2. Naudojant kai kuriuos mielių grybelius gali atsirasti rožinė spalva. Tai reikia laikyti teigiamą reakciją.

IDENTIFIKAVIMO REAKCIJŲ PRINCIPAS

Aminorūgšties β-naftilamido substratai (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – kai substratas hidrolizuojamas atitinkamu fermentu (paprastai aminorūgšties arilamidaze), išsiskiria β-naftilaminas. β-naftilaminas aptinkamas pridėjus p-dimetilamincinaldehido (esančio peptidazės reagentu), kuris sukuria nuo rožinės iki purpurinės kintančios spalvos kompleksą.

PASTABA: aminorūgšties β-naftilamidą skaidantis fermentas yra aminorūgšties arilamidazė. Terminas „aminopeptidazė“ dažnai vartojamas kaip arilamidazės sinonimas, tačiau iš tikrųjų reiškia skirtingo specifškumo fermentą (aminopeptidazė atskiria N-galinę aminorūgštį nuo peptido). Arilamidazė ir aminopeptidazė gali hidrolizuoti tą patį aminorūgšties β-naftilamido substratą. Todėl plokštelė nebūtinai nustato skirtingus ir unikalius fermentus. Viena arilamidazė gali hidrolizuoti keletą aminorūgšties β-naftilamidų.

Angliavandeniai (SUC1, SUC2, TRE) –kai naudojama sacharozė ir trehalozė, sumažėja pH, todėl chlorfenolio raudonojo spalva iš purpurinės pasikeičia į geltoną. Šios angliavandenių reakcijos yra selektyvios ir gali neatitikti įprastų reakcijų.

Nitrofenilo susbstratai (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – jei yra atitinkamas fermentas, substratas suskaidomas ir išsiskiria orto- arba para-nitrofenolis. Esant šarminiai pH šie junginiai yra geltoni. Jei reakcija vyksta esant rūgštinei pH, kad galėtumėte nuskaityti rezultatus, po inkubacijos reikia pridėti NaOH. Prieš pridėdant natrio hidroksido šulinėliai gali būti bespalviai arba blankiai geltonos spalvos.

Indoksilo fosfatazė (IDX) – indoksilo fosfatazė suskaido indoksilo fosfatą ir išsiskiria indoksilas. Indoksilas jungiasi su deguonimi, sudarydamas indigo mėlį, kuris yra netirpios mėlynos arba mėlynai-pilkos nuosėdos.

Šlapalas (URE) – ureazė skaido šlapalą, sudarydama amoniaką ir anglies dioksidą. Dėl amoniako (amonio karbonato pavidalu) padidėja pH, kuri aptinkama fenolio raudonojo spalvai pakitus iš geltonos į raudoną.

MIKROORGANIZMŲ IDENTIFIKAVIMAS

„MicroScan“ greitųjų mielių grybelių biotipų kodų knygelė naudojama nežinomiems tiriamiesiems mikroorganizmams identifikuoti. Ši identifikavimo plokštelėje esančių tyrimų kodų knygelė sudaryta iš „MicroScan“ duomenų bazės. Mielų grybelių kodų knygelė pagrįsta kompiuterine 27 tyrimų, atliktų greitojoje mielių grybelių identifikavimo plokštelėje, analize. Tyrimo rezultatai paverčiami 9 skaitmenų biotipo numeriu, pagal kurį kodų knygelėje nurodomos identifikuotos rūšys ir identifikacijos suminė santykinė tikimybė. Visos galimos identifikacijos spausdinamos mažėjančia tvarka nuo didžiausios tikimybės iki suminės bendros 99,9 % tikimybės.

Jei gaunamas biotipo numeris, kurio nėra kodų knygelėje, pirmiausia reikia ieškoti procedūros klaidos, pvz., neteisingai pridėto biotipo numerio ar klaidingai užrašytos reakcijos. Jei biotipo numeris teisingas, reikia patikrinti mišrios kultūros tikimybę ir iš naujo ištirti mikroorganizmą užtikrinant, kad būtų naudojama pakankamai drumsta ląstelių suspensija. Jei pakartotinai atlikus tyrimą gaunami tie patys rezultatai, kreipkitės į biotipų paieškos tarnybą „Beckman Coulter“ interneto svetainėje arba į vietinį platintoją.

METODO APRIBOJIMAS

- Greitosios mielių grybelių identifikavimo plokštelės skirtos mielių grybeliams ir mielių grybelių tipo mikroorganizmams (pvz., *Prototheca*) identifikuoti. Reikia būti atsargiems su mikroorganizmais, itin gausiai gaminančiais hifus.
- Jei pateikta daugiau nei viena tam tikro biotipo numerio rūšies identifikacija, gali reikėti papildomų tyrimų. Priimtinomis mielių grybelių ir mielių grybelių tipo mikroorganizmų identifikavimo procedūromis taip pat yra kolonijų morfologija, augimas aukštesnėje temperatūroje, pigmentų susidarymas ir spalva fenoloksidazės agare. Mikroskopinė morfologija terpėje, skirtoje išgauti įprastinę morfologiją, taip pat gali padėti identifikuoti šiuos mikroorganizmus. Žr. atitinkamas mikologijos referentines procedūras.^{5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13}

3. Chromogeninių rezultatų pokyčių gali atsirasti pernelyg gausiai arba nepakankamai inokuliuavus sistemą. Kiekvieną inokuliantą reikia palyginti su drumstumo standartu, kad būtų pasiekta reikiama inokulianto koncentracija ir optimalios tyrimo analitinės charakteristikos.

KOKYBĖS KONTROLĖ

Identifikavimo substratų priimtinumą reikia patikrinti ištiriant mikroorganizmus, kurių reakcijos yra žinomos. Kiekvieno rekomenduojamo „MicroScan“ kontrolinio mikroorganizmo reakcijos rezultatai nurodyti kokybės kontrolės lentelėje, kuri pateikta šioje instrukcijoje.

Kokybės kontrolės lentelė – greitojo mielių grybelių identifikavimo substratai

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Lentelėje pažymėtos KK specifikacijos bus įdiegtos programinės įrangos „LabPro“ versijose ≥ 1.90.

1. Amerikos kultūrų tipų kolekcija, Manassas, VA USA
2. Teigiamą rezultatą galima gauti naudojant *Rhodotulura rubra*, ATCC 66034.
3. Neigiamą rezultatą galima gauti naudojant *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Prietaiso nuskaitytus duomenis gali reikėti patikrinti apžiūrint.
5. Teigiamą rezultatą galima gauti naudojant *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

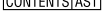
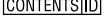
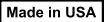
Pastaba: kokybės kontrolės mikroorganizmai pasirenkami siekiant gauti visų identifikavimo substratų teigiamas / neigiamas reakcijas. Dėl to mikroorganizmų identifikacija gali skirtis nuo pateiktos KK lentelėje. Gaminio priimtinumą reikia nustatyti lyginant tyrimų rezultatus, o ne identifikavimą.

PRANEŠIMAS DĖL GARANTIJOS

Sistemai taikomos garantijos nuostatos, įtrauktos į sistemos arba jos reagentų sutartį. Už įprastines profilaktinės priežiūros procedūras atsakingas klientas. Jeigu nurodytais laiko intervalais neatlikus šių priežiūros procedūrų sistemą reikėtų taisyti, tokius remonto darbus „Beckman Coulter“ atlieka savo nuožiūra ir kliento sąskaita.

Simbolių sutartiniai ženklai

Simbolių sutartiniai ženklai			
Simbolis	Simbolio pavadinimas	Standarto aprašas	Etaloninė medžiaga
Ⓢ	Nenaudoti pakartotinai	Nurodoma, kad medicinos prietaisas skirtas naudoti tik vieną kartą arba naudoti tik vienam pacientui vienos procedūros metu.	ISO 15223-1; 5.4.2
⌚	Sunaudoti iki nurodytos datos	Nurodoma data, po kurios medicinos prietaiso nebegalima naudoti.	ISO 15223-1; 5.1.4

Simbolių sutartiniai ženklai			
Simbolis	Simbolio pavadinimas	Standarto aprašas	Etaloninė medžiaga
	Partijos kodas	Nurodomas gamintojo serijos kodas, kad būtų galima identifikuoti seriją arba partiją.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Katalogo numeris	Nurodomas gamintojo katalogo numeris, kad būtų galima identifikuoti medicinos prietaisą.	ISO 15223-1, 5.1.6 skyrius
	Gamintojas	Nurodomas medicinos prietaiso gamintojas, kaip apibrėžiama ES direktyvose 90/385/EEB, 93/42/EEB ir 98/79/EB.	ISO 15223-1, 5.1.1 skyrius
	Pagaminimo data	Nurodoma medicinos prietaiso pagaminimo data.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Igaliojtas atstovas Europos Bendrijoje	Nurodomas įgaliojasis atstovas Europos Bendrijoje.	ISO 15223-1, 5.1.2 skyrius
	Turinio pakanka <n> tyrimų	Nurodoma, kiek iš viso IVD tyrimų galima atlikti naudojant IVD. (Dažniausiai nurodoma ant reagentų rinkinių.)	ISO 15223-1; 5.5.5
	In vitro diagnostikos medicinos prietaisas	Šiuo simboliu žymimas medicinos prietaisas, skirtas naudoti tik kaip in vitro diagnostikos medicinos prietaisas.	ISO 15223-1, 5.5.1 skyrius
	Temperatūros ribojimai	Nurodomos medicinos prietaisui saugios temperatūros ribos.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Skaitykite naudojimo instrukciją	Nurodoma, kad naudotojas turi skaityti naudojimo instrukcijoje pateikiamą informaciją.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE ženklas	Europos direktyvų atitikties reguliacinis ženklas	netaikoma
	Rinkinio sudėtis	netaikoma	netaikoma
	Turinys (pakuotė)	Antimikrobinė medžiaga (santrumpa)	netaikoma
	Turinys (pakuotė)	Identifikavimo substratas (santrumpa)	netaikoma
	Saugos duomenų lapas	Nurodomas saugos duomenų lapas.	netaikoma
	Made in USA	netaikoma	netaikoma
	Tik eksportui	netaikoma	netaikoma
	Paruošimo tūris	netaikoma	netaikoma
	Trapus, elgtis atsargiai	Nurodoma, kad nerūpestingai elgiantis medicinos prietaisas gali sulūžti arba sugesti.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Šia kryptimi į viršų	Nurodoma tinkama stačia padėtis	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: Medicinos priemonės. Medicinos priemonių etiketėse, ženklavimo ir teiktinoje informacijoje vartotini simboliai. 1 dalis. Bendrieji reikalavimai).			

„Beckman Coulter“, stilizuotas logotipas ir kiti šiame dokumente nurodyti „Beckman Coulter“ gaminių ir prekių ženklai yra „Beckman Coulter, Inc.“ prekių ženklai arba registruotieji prekių ženklai Jungtinėse Amerikos Valstijose ir kitose šalyse.

MicroScan

A gyors sarjadzógomba-azonosítási eljárás kézikönyve

REF B1017-70

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

A gyors sarjadzógomba-azonosító panel a klinikai mintákból izolált sarjadzógombák és sarjadzógomba-szerű fajok gyors azonosítására lett kialakítva.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ELVEK

A klinikai mintákból izolált sarjadzógombafajok azonosítását kromogén és módosított hagyományos tesztekkel végzik. A gyors sarjadzógomba-azonosító panel egy 96 cellás mikrodilúciós panel, amely 27 dehidratált szubsztrátot használ fel (Lásd 1-1. táblázat). A szubsztrátok rehidratálásához a sarjadzógomba autoklávozott vízben készített sűrű szuszpenzióját használják. Az azonosítás a panel 35–37 °C-on, 4 órán át való inkubálása után történik.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. A gyors sarjadzógomba-azonosító panelek kizárólag *in vitro* diagnosztikai használatra szolgálnak.
2. Ügyeljen rá, hogy a peptidáz, a nátrium-hidroxid reagens vagy az azonosító szubsztrátok ne kerüljenek szembe, bőrre vagy ruházatra.
3. Valamennyi eljárás során aszeptikus technikát kell alkalmazni, és be kell tartani a mikrobiológiai veszélyek ellen bevezetett óvintézkedéseket, mindig szem előtt tartva, hogy a beoltott panelek potenciálisan kórokozó mikroorganizmusokat tartalmaznak.
4. Kidobás előtt minden anyagot autoklávozni kell.

TÁROLÁS

A paneleket és a peptidáz reagenst 2–8 °C között tárolja.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Nincs veszélyes anyagként besorolva.

SDS

A biztonsági adatlap megtalálható a következő internetes helyen:
techdocs.beckmancoulter.com

MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A sarjadzógombák szállításához és izolálásához javasolt eljárásokat megtalálja az American Society for Microbiology (Amerikai Mikrobiológiai Társaság) Manual of Clinical Microbiology (Klinikai mikrobiológiai kézikönyv) című kiadványában¹ vagy más mikológia referencia-kézikönyvben. A gyors kromogén tesztek az ismeretlen mikroorganizmusokban eleve jelen lévő enzimeken alapulnak.^{2,3,4} Ezért a táptalajlemez, amelyen a mikroorganizmus nő, befolyásolhatja a vizsgálat eredményeit, mivel a különböző táptalajok különböző enzimek termelését indukálják. A gyors sarjadzógomba-azonosító panel a (standard vagy Emmons-féle módosított) Sabouraud dextróz agar használatán alapul. Az antibiotikumok jelenléte a táptalajban nem kritikus tényező; azonban ne használjon vért, sarjadzógomba-kivonatot és malátakivonatot (YM) tartalmazó agart, illetve penészgátló agart (IMA).

SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

Gyors sarjadzógomba-azonosító panelek (B1017-70)

Munkalap

Az eljárás útmutatója

Minőség-ellenőrzési grafikon

SZÜKSÉGES, DE NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

Inokulumfolyadék (B1015-2)

0,05 N nátrium-hidroxid (B1015-3)

Peptidáz reagens (B1012-30B)

Sarjadzógomba-turbiditási szabvány (B1015-18)

Fedőtálcák (B1010-56B)

MicroScan sarjadzógomba-biotípus kódgyűjtemény (B1014-1A)

Oltókacsok

Sabouraud dextróz agarlemezek

Vortex keverő

50 µL-es pipettázó hegyekkel

Inkubátor (35–37 °C), nem-CO₂

Minőség-ellenőrzési mikroorganizmusok:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

ELJÁRÁS

A panelek előkészítése

1. Vegye ki a tárolóból a használandó paneleket. **Ne használjon olyan paneleket, amelyek mellett nincs vagy tönkrement a szárítószer, vagy ha a csomagolásuk sérült (fel van bontva, ki van szűrve vagy elszakadt).**
2. Vágja fel a tasakot, és vegye ki belőle a panelt. Azonnal távolítsa el a panelt a védőfóliából. A rehidratálás előtt hagyja a paneleket szobahőmérsékletűre melegedni. A panelek egymásra helyezhetők; a legfelső panelre tiszta fedőtálcát kell helyezni.

Inokulum elkészítése

1. Inokulálja a gyors sarjadzógomba-azonosító panelt egy aktívan növekvő mikroorganizmussal. Ehhez felhasználható egy Sabouraud dextróz agarlemezről származó primer izolátum, ha elegendő növekedés van jelen. Szükség esetén hozzon létre másodlagos tenyészetet a sarjadzógomba-izolátumból Sabouraud dextróz agarlemezen, és inkubálja, amíg elegendő mértékű növekedés tapasztalható. Ajánlott 48 órán át 30 °C-on vagy 48–72 órán át 25 °C-on (szobahőmérsékleten) inkubálni.

MEGJEGYZÉS: A 30 °C-on 48 óránál tovább inkubált tenyészeteket csak akkor használja, ha további inkubáció szükséges a megfelelő mértékű növekedés eléréséhez.

2. Egy steril tampon vagy oltókacs segítségével távolítsa el az agarlemezről a kinőtt telepet, és emulgeálja 3 mL inokulumfolyadékban (autoklávozott, deionizált víz 13 x 84 mm-es vagy 13 x 100 mm-es mintacsőben). Minden egyes szuszpenziót össze kell hasonlítani, és minden szuszpenzióknak meg kell felelnie a MicroScan sarjadzógomba-turbiditási szabványnak. A tesztelendő inokulumszuszpenzió és a sarjadzógomba-turbiditási szabvány összehasonlítását egy megfelelő fényforrás használatával kell elvégezni, egy fekete kontrasztvonalakkal ellátott fehér kártyához hasonlítva a tesztcsöveket.

MEGJEGYZÉS: Ügyeljen rá, hogy a mikroorganizmussal ne távolítson el agar táptalajt is.

3. Keverje vagy vortexelje homogénre a szuszpenziót. Egyes sarjadzógomba-törzsek sejtjei nem könnyen oszlanak szét vizes közegben. Ha a vortexelés nem eredményez homogén szuszpenziót, akkor pihentesse a szuszpenziót 10–15 percre, majd vortexelje újra. Ha a szuszpenzióban még mindig találhatók összetapadt csomók, hagyja őket leülepedni a mintacső aljára, és a sarjadzógomba-panel beoltásához használja a felülúszót. A felülúszó turbiditásának meg kell egyeznie a MicroScan sarjadzógomba-turbiditási szabvánnyal. Ha nem egyezik, vigyen be több növekvő telepet az inokulumfolyadékba, és ismételje meg a fenti eljárást.

MEGJEGYZÉS: NE pipettázzon sejtcsomókat a sarjadzógomba-panel celláiba.

Panelinokuláció

1. Címkezza fel a panelt, és tüntesse fel rajta a minta számát.
2. Adjon hozzá 50 µL sarjadzógomba-suszpenziót minden egyes szubsztrátot tartalmazó cellához, plusz a BNAC és NPC kontrollcellákhoz. Az inokulációhoz nem ajánlott a Pasteur-pipetta használata.

1-1. táblázat, Szubsztrátok

Szubsztrátok	Röv.	Szubsztrátok	Röv.
Hidroxiprolin-β-naftilamid	HPR	L-hisztidin-β-naftilamid	HIS
L-izoleucin-β-naftilamid	ILE	Szacharóz	SUC1
L-prolin-β-naftilamid	PRO	Szacharóz	SUC2 ¹
L-tirozin-β-naftilamid	TYR	Trehalóz	TRE
Glicin-β-naftilamid	GLY	p-nitrofenil-α-D-glükopiranozid	AGL1
Glicil-glicin-β-naftilamid	GGLY	p-nitrofenil-α-D-glükopiranozid	AGL2 ¹
Glicil-L-arginin-4-metoxi-β-naftilamid	GLAR	p-nitrofenil-β-D-glükopiranozid	BGL
Glicil-L-prolin-4-metoxi-β-naftilamid	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid	BGAL
L-arginil-L-arginin-β-naftilamid	AARG	p-nitrofenil-β-D-fukopiranozid	BDF

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Szubsztrátok	Röv.	Szubsztrátok	Röv.
L-lizil-L-alanin-4-metoxi-β-naftilamid	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galaktopiranozid	AGAL
L-alanin-4-metoxi-β-naftilamid	ALA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glükózamin	NAG
L-szeril-L-tirozin-β-naftilamid	STY	p-nitrofenil-β-D-cellobióz	CELL
Urea	URE	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galaktózaminid	NGAL
3-indoxil-foszfát	IDX		

1. Ugyanazon szubsztrátok különböző készítményeit használja.

3. Miután inokulálta a panelt az 50 µL inokulummal, finoman ütögesse meg a panel minden oldalát, hogy elősegítse a szubsztrátummal való megfelelő elkeveredését.

MEGJEGYZÉS: Ha a panel leolvasása WalkAway vagy autoSCAN-4 készüléken történik, a LOC cellát is inokulálni kell.

Inkubálás

1. Pakoljon egymásra 3–5 darab panelt, a legfelsőre helyezzen fedőtálcát, hogy megakadályozza a párolgást.
2. Az inokulált paneleket 4 órán át kell inkubálni 35–37 °C-on, nem CO₂ inkubátorban.

Panelek leolvasása

1. Távolítsa el a peptidáz reagenst a hűtőből legalább 30 perccel a panelek leolvasása előtt. A peptidáz reagens csapadékot képezhet 4 °C-on, de szobahőmérsékleten újra feloldódik. Ne tegye ki a peptidáz reagenst magas hőmérséklet hatásának a kristályos csapadék visszaoldódásának felgyorsítása érdekében, mert magas hőmérsékleten a reagens hőbomlást szenved.
2. Egy fehér háttérrel visszaverődő fény segítségével olvassa le a paneleket.
3. 4 órányi inkubációt követően adja hozzá a peptidáz és a nátrium-hidroxid (NaOH) reagenseket a megfelelő cellákhoz.

- A. Adjon hozzá **1 csepp** peptidáz reagenst a BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY és HIS cellákhoz. A szín megjelenéséhez várjon 30 másodpercet az eredmények feljegyzése előtt. Az eredményeket a reagens hozzáadása után 3 percen belül fel kell jegyezni. Ha a cella egészében vagy bármely részében megjelenik a rózsaszín vagy vörös BÁRMELY árnyalata az oldatban, az pozitív eredményként értékelendő. A kapott színt össze kell vetni a BNAC celláéval. Egyes cellák sötétebb narancssárga színűek lehetnek, mint a BNAC cella. Ezeket negatívként kell feljegyezni. A reakció kizárólag akkor tekinthető pozitívnak, ha az oldatban rózsaszín vagy vörös színárnyalat figyelhető meg. A szín idővel elsötétedik ezekben a cellákban. A negatív citromsárga szín sötétebb narancssárgává válhat. Ezt negatív reakcióként kell értelmezni.

MEGJEGYZÉS: A peptidáz BNAC cellához való hozzáadását követően sárga színnek kell megjelennie. Ha bármennyi rózsaszín vagy vörös jelenik meg, ne használja a peptidáz reagenst.

- B. Adjon hozzá **1 csepp** 0,05 N NaOH-t az AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL és NGAL cellákhoz. Várjon legalább 5 másodpercet, de legfeljebb 5 percet, mielőtt leolvasná az eredményeket. A sárga bármely árnyalata pozitív eredményként jegyzendő. Hasonlítsa össze a szubsztrátot tartalmazó cellák és a NPC cella színét.

MEGJEGYZÉS: Ezek a cellák sötétebbnek tűnhetnek, mint a NPC cellák. Ezt negatív eredményként kell értékelni, az elfogadható pozitív eredményhez viszont jelen kell lennie a sárga színnek.

4. A reakciók értékelését a panel két kontroll cellája segíti.
 - A. BNAC = β-naftilamid kontroll. A peptidáz reagens hozzáadását követően ez a cella sárga színű lesz.
 - B. NPC = nitrofenil kontroll. Ennek a cellának színtelennek kell lennie.
5. A biokémiai értelmezéshez segítségként lásd az EREDMÉNYEK című részt.

MEGJEGYZÉS: A WalkAway azokat a cellákat olvassa le először, amelyek nem igényelnek reagenst, hogy megelőzze az eredmények a tálcafedél alatt rekedt reagensgőzök miatti módosulását, ezért a biokémiai reakciókat nem lehet manuálisan ellenőrizni.

EREDMÉNYEK

Szubsztrátértelmezések

Well	Reagent	Pozitív	Negatív
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Adjon hozzá 1 csepp peptidáz reagenst. Várjon legalább 30 másodpercet, de legfeljebb 3 percet, hogy kialakuljon a színreakció.	Rózsaszín, vörös vagy bíborvörös (magenta) színek bármelyik árnyalata az oldatban ¹	Sárga-narancssárga
SUC1 SUC2 TRE		A barna vagy sárga bármely színárnyalata	Lila
AGL1 BGL BGAL	Hasonlítsa össze az NPC kontrollcellával.	A citromsárga bármely árnyalata ²	Átlátszó
URE		Rózsaszíntől bíborvörösig	Átlátszó/bézs-sárga
IDX		A kék bármely árnyalata	Átlátszó
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Adjon hozzá 1 csepp 0,05 N NaOH-t. Várjon legalább 5 másodpercet, de legfeljebb 5 percet, mielőtt leolvassná az eredményt. Hasonlítsa össze az NPC kontrollcellával.	A citromsárga bármely árnyalata ²	Átlátszó

1. A pozitív szín nem feltétlenül van jelen az egész cellában.

2. A rózsaszín jelen lehet egyes sarjadzógombák esetében. Ezt pozitív reakciónak kell tekinteni.

AZ AZONOSÍTÁSI REAKCIÓK ALAPELVEI

Aminosav β -naftilamid szubsztrátok (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Amikor a szubsztrátot hidrolizálja a megfelelő enzim (általában egy aminosav-arilamidáz), β -naftilamin szabadul fel. A β -naftilamin a p-dimetilamino-fahéjaldehid (a peptidáz reagensben található) hozzáadásával detektálható, amely egy rózsaszín-lila színű komplexet képez.

MEGJEGYZÉS: Az enzim, amely elhasít egy aminosav- β -naftilamidot, az ún. aminosav-arilamidáz. Az „aminopeptidáz” kifejezést gyakran használják az arilamidáz szinonimájaként, valójában azonban egy attól eltérő specificitású enzimről van szó (egy aminopeptidáz az N-terminális aminosavat hasítja le egy peptidről). Egy arilamidáz és egy aminopeptidáz ugyanazt az aminosav- β -naftilamid szubsztrátot is hidrolizálhatja. Ezért a panel nem szükségképpen mér különböző, egyedülálló enzimeket. Egyetlen arilamidáz több aminosav- β -naftilamidot is hidrolizálhat.

Szénhidrátok (SUC1, SUC2, TRE) – A szacharóz és trehalóz felhasználása pH-csökkenést eredményez, amelynek hatására a klórfenolvörös indikátor színe liláról citromsárgára változik. Ezek a szénhidrát-reakciók szelektívek, és nem mindig alkalmazkodnak a hagyományos reakciókhoz.

Nitrofenil szubsztrátok (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Ha jelen van a megfelelő enzim, elhasítja a szubsztrátot, és felszabadul az orto- vagy para-nitrofenol. Lúgos pH mellett ezek a vegyületek citromsárga színűek. Ha a reakció savas pH-n megy végbe, NaOH-t kell adni a reakcióelegyhez az inkubálás után, mielőtt az eredmények leolvashatóvá válnának. A cellák a nátrium-hidroxid hozzáadása előtt lehetnek színtelenek vagy halványsárgák.

Indoxil-foszfátáz (IDX) - Az indoxil-foszfátot egy foszfátáz enzim hasítja el, és indoxil szabadul fel. Az indoxil oxigénnel kombinálva indigókéket alkot, ami oldhatatlan, kék vagy kékeszürke csapadékot képez.

Urea (URE) - Az ureát az ureáz enzim ammónia és szén-dioxid képződése mellett bontja. Az ammónia (ammónium-karbonát formában) pH-növekedést okoz, amelyet a sárgáról vörös színűre változó fenolvörös indikátor detektál.

MIKROORGANIZMUSOK AZONOSÍTÁSA

Az ismeretlen vizsgálati mikroorganizmusok azonosításához használja a MicroScan gyors sarjadzógomba-biotípus kódgyűjteményt. Ezt a kódgyűjteményt a MicroScan adatbázisa alapján generálták az azonosító panelen szereplő tesztekhez. A sarjadzógomba-kódgyűjtemény a gyors sarjadzógomba-azonosító panelen végzett 27 teszt eredményeinek számítógépes analízisén alapul. A teszteredményeket 9 jegyű biotípusszámmá alakítják, amelyhez a kódgyűjtemény

listáz egy faji azonosítót és egy kumulatív, relatív azonosítási valószínűséget. Az összes lehetséges azonosítás csökkenő sorrendben lesz kinyomtatva a legnagyobb valószínűségűtől kezdve, és a lehetőségek kumulatív (összesített) valószínűségi értéke 99,9%.

Amennyiben megjelenik egy olyan biotípuszám, amely nem található meg a jelkódexben, először eljáráshibára kell gyanakodni, például a biotípuszám helytelenül lett megadva, vagy egy reakció tévesen lett rögzítve. Ha a biotípuszám helyes, akkor ellenőrizni kell egy kevert kultúra lehetőségét, és a mikroorganizmust újra kell tesztelni, külön hangsúlyt fektetve a megfelelően zavaros (sűrű) sejtuszpenzió használatára. Ha az újratestelés is ugyanazokat az eredményeket adja, használja a Beckman Coulter honlapján a Biotype Lookup Service (Biotípus-kereső szolgáltatás) funkciót, vagy konzultáljon a területi cégképviseléttel.

A MÓDSZER KORLÁTAI

- A gyors sarjadzógomba-azonosító paneleket sarjadzógombák és sarjadzógomba-szerű mikroorganizmusok (pl. *Prototheca*) azonosítására tervezték. A túl sok hifát (gombafonalat) termelő mikroorganizmusokkal bányon óvatosan.
- Ha egynél több faj azonosítása lenne felsorolva egy adott biotípuszám mellett, kiegészítő vizsgálatokra lehet szükség. A sarjadzógombák és sarjadzógomba-szerű mikroorganizmusok elfogadott azonosítási eljárásai közé tartoznak az alábbiak: telepmorfológia, növekedés magas hőmérsékleten, pigmentképzés és elszíneződés fenoxidázos agar táptalajon. A tipikus morfológiájú növekedés kiváltására tervezett táptalajon megfigyelt mikroszkopikus morfológia szintén segíthet ezen mikroorganizmusok pontos azonosításában. Ezzel kapcsolatban olvassa el a megfelelő mikológiai referenciaeljárásokat.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
- A kromogén eredményekben előfordulhatnak eltérések a rendszer túl erős vagy túl gyenge inokulációja következtében. Minden egyes inokulumot össze kell vetni a turbiditási szabvánnyal, hogy helyes inokulumkoncentrációt kapjon az optimális kimutatás érdekében.

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

Az azonosító szubsztrátok elfogadhatóságát olyan mikroorganizmusok vizsgálatával kell ellenőrizni, amelyeknél ismertek a válaszreakciók. Az egyes reakciók eredményei az ajánlott MicroScan kontroll mikroorganizmusok esetében megtalálhatók a jelen használati útmutató Quality Control Chart (Minőség-ellenőrzési táblázat) részében.

Gyors sarjadzógomba-azonosítási szubsztrátok minőség-ellenőrzési táblázata

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

A fenti táblázatban az árnyékolt minőség-ellenőrzési értékekkel fog számolni a LabPro ≥ 1.90-es verziószámú szoftver.

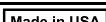
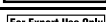
- American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
- Pozitív teszteredmény kapható a *Rhodoturula rubra*, ATCC 66034 törzzsel.
- Negatív teszteredmény kapható a *Candida lusitanae* ATCC 66035 törzzsel.
- A készülék leolvasásai vizuális ellenőrzést igényelhetnek.
- Pozitív teszteredmény kapható a *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036 törzzsel.

Megjegyzés: Úgy választottak ki minőség-ellenőrzési mikroorganizmusokat, hogy pozitív/negatív reakciókat adjanak minden azonosító szubsztrátra. Ennek eredményeként a mikroorganizmus-azonosítás eltérhet a minőség-ellenőrzési táblázatban feltüntetettektől. A termékteljesítmény elfogadhatóságát nem azonosítással, hanem a teszteredmények összehasonlításával kell meghatározni.

JÓTÁLLÁSI NYILATKOZAT

A rendszerre, illetve reagenseire a vonatkozó szerződéses megállapodásban szereplő garanciális rendelkezések vonatkoznak. A rutin megelőző karbantartási eljárások elvégzése az ügyfél felelőssége. Az ezen karbantartási eljárások feltüntetett időtartamon belüli időközönként történő végrehajtásának elmulasztása miatt szükségessé váló javítások elvégzéséről a Beckman Coulter saját belátása szerint dönt; az ilyen javítások költségei az ügyfelet terhelik.

Szimbólumok listája

Szimbólumok listája			
Szimbólum	Szimbólum megnevezése	Standard leírása	Standard
	Ne használja újra	Olyan gyógyászati eszközt jelöl, amely nem használható fel újra, azaz csak egyetlen eljárás során, egyetlen betegen használható.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Lejárat dátum	Azt a dátumot jelöli, amely után a gyógyászati eszköz már nem használható fel.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Tételkód	A tétel vagy a sarzs beazonosítására szolgáló gyártói tételkódot jelöli.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Katalógusszám	A gyógyászati eszköz beazonosítására szolgáló gyártói katalógusszámot jelöli.	ISO 15223-1, 5.1.6-os záradék
	Gyártó	A gyógyászati eszköz gyártóját jelöli a 90/385/EGK, a 93/42/EGK és a 98/79/EK jelű európai uniós irányelveknek megfelelően.	ISO 15223-1, 5.1.1-es záradék
	Gyártás dátuma	A gyógyászati eszköz gyártásának dátumát jelöli.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben	Az Európai Közösségen belüli hivatalos képviselőt jelöli.	ISO 15223-1, 5.1.2-es záradék
	<n> teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz	Az IVD-eszközzel végrehajtható IVD-tesztek teljes számát jelöli. (A reagenskészletek általában tartalmazzák).	ISO 15223-1; 5.5.5
	In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló gyógyászati eszköz	Olyan gyógyászati eszközt jelöl, amely in vitro diagnosztikai gyógyászati eszközként alkalmazandó.	ISO 15223-1, 5.5.1-es záradék
	Hőmérséklet-korlátozás	A gyógyászati eszköz számára megfelelő hőmérséklet-tartományt jelöli.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Olvassa el a használati utasítást	Arra utasítja a felhasználót, hogy tekintse át a használati utasítást.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE jelzés	Európai megfelelőségi jelölés	n. a.
	Tartalom	n. a.	n. a.
	Tartalom (csomag)	Antimikrobiális szer (rövidítés)	n. a.
	Tartalom (csomag)	Azonosításhoz használt szubsztrát (rövidítés)	n. a.
	Biztonsági adatlap	Biztonsági adatlap jelölése.	n. a.
	Made in USA	n. a.	n. a.
	Kizárólag exportra szánt termék	n. a.	n. a.
	Feloldási térfogat	n. a.	n. a.
	Törékeny, óvatosan kezelendő	Olyan gyógyászati eszközt jelöl, amely eltörhet vagy károsodhat, ha nem kellő körültekintéssel kezelik.	ISO 15223-1; 5.3.1

Szimbólumok listája			
Szimbólum	Szimbólum megnevezése	Standard leírása	Standard
	Felfelé	A megfelelő függőleges helyzetet jelöli	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: Orvostechikai eszközök. Orvostechikai eszközök címkéin, címkézésén és tájékoztatóiban használandó szimbólumok. 1. rész: Általános követelmények)			

A Beckman Coulter, a stilizált logó, valamint az itt említett Beckman Coulter termék- és szolgáltatásjegyek a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei az Egyesült Államokban és más országokban.

MicroScan

Podręcznik procedur szybkiej identyfikacji drożdży

REF B1017-70

ZASTOSOWANIE

Panel do szybkiej identyfikacji drożdży jest przeznaczony do szybkiej identyfikacji gatunków drożdży oraz gatunków drożdżopodobnych izolowanych z próbek klinicznych.

OMÓWIENIE I ZASADA DZIAŁANIA

Testy chromogeniczne i zmodyfikowane testy konwencjonalne służą do identyfikacji gatunków drożdży izolowanych z próbek klinicznych. Panel do szybkiej identyfikacji drożdży to 96-studzienkowy panel mikrorozcieńczeń, który wykorzystuje 27 odwodnionych substratów (patrz Tabela 1-1). Do powtórnego uwadniania substratów służy ciężka zawiesina drożdży w autoklawowanej wodzie. Identyfikacje uzyskuje się po inkubacji panelu przez 4 godziny w temperaturze 35–37°C.

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Panele do szybkiej identyfikacji drożdży są przeznaczone wyłącznie do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
2. Nie dopuścić do kontaktu odczynników: peptydazy, wodorotlenku sodu ani dowolnego z substratów identyfikacyjnych z oczami, skórą lub odzieżą.
3. Przy wykonywaniu wszystkich procedur z uwzględnieniem kwestii, że inokulowane panele zawierają potencjalnie chorobotwórcze drobnoustroje, należy stosować techniki aseptyczne i środki ostrożności wymagane podczas pracy z mikroorganizmami potencjalnie patogennymi.
4. Wszystkie materiały należy przed utylizacją autoklawować.

PRZECHOWYWANIE

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

KLASYFIKACJA ZAGROZEŃ WG GHS

Substancja niesklasyfikowana jako niebezpieczna

SDS

Karta charakterystyki jest dostępna w witrynie techdocs.beckmancoulter.com

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Zalecane procedury transportu i izolacji drożdży, patrz dokument Manual of Clinical Microbiology (Podręcznik mikrobiologii klinicznej) Amerykańskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego¹ lub inne referencyjne podręczniki mykologiczne. Szybkie testy chromogeniczne opierają się na obecności określonych enzymów w nieznanych mikroorganizmach.^{2,3,4} Dlatego podłoże do wysiewania, na którym rośnie mikroorganizm będzie wpływać na wyniki testu ze względu na indukcję różnych enzymów przez różne podłoża. Panel do szybkiej identyfikacji drożdży opiera się na stosowaniu agaru Sabouraud z dekstrozą (standardowego lub modyfikacji Emmonsa). Obecność antybiotyków w podłożu wzrostu nie jest kluczową zmienną, jednak nie należy stosować podłoży zawierających krew, agaru wyciągu z drożdży-wyciągu maltozowego (ang. Yeast Extract-Malt Extract, YM) oraz agaru hamującego pleśń (ang. Inhibitory Mold Agar, IMA).

MATERIAŁY DOSTARCZONE

Panele do szybkiej identyfikacji drożdży (B1017-70)

Arkusz roboczy

Procedura ręczna

Tabela kontroli jakości

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Woda inokulacyjna (B1015-2)

0,05 N wodorotlenek sodu (B1015-3)

Odczynnik peptydazowy (B1012-30B)

Wzorzec zmętnienia drożdży (B1015-18)

Tace pokrywowe (B1010-56B)

Książka kodów biotypu drożdży MicroScan (B1014-1A)

Ezy do posiewów

Płytki agaru Sabouraud z dekstrozą

Wytrząsarka do probówek

Pipetor 50 µL z końcówkami

Inkubator (35–37°C), niezawierający CO₂

Mikroorganizmy kontroli jakości:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDURA

Przygotowanie paneli

- Wyjąć panele z miejsca przechowywania. **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

- Inokulować panel do szybkiej identyfikacji drożdży z aktywnie rosnącym mikroorganizmem. Kolonie z pierwotnej izolacji płytki agaru Sabouraud z dekstrozą mogą być stosowane, jeżeli obecny jest wystarczający wzrost. W razie potrzeby wykonać podhodowlę izolatu drożdży bezpośrednio na płytkę agaru Sabouraud z dekstrozą i inkubować do wystąpienia wystarczającego wzrostu. Zalecana jest inkubacja przez 48 godzin w temperaturze 30°C lub od 48 do 72 godzin w temperaturze 25°C (temperatura pokojowa).

UWAGA: hodowle inkubowane przez ponad 48 godzin w temperaturze 30°C należy stosować jedynie wtedy, gdy do uzyskania odpowiedniego wzrostu wymagana jest dodatkowa inkubacja.

- Stosując jałową wymazówkę lub eżę do posiewów, usunąć wzrost z płytki agaru i emulsyfikować w 3 mL wody inokulacyjnej (autoklawowana woda dejonizowana w probówce 13 x 84 mm lub 13 x 100 mm). Każda zawiesina musi być porównana i równoważna wzorcowi zmętnienia drożdżowego MicroScan. Porównanie zawiesiny inokulacyjnej testu ze wzorcem zmętnienia drożdżowego należy przeprowadzać przy użyciu odpowiedniego źródła światła i porównując próbki z próbką z białą kartą zawierającą kontrastujące czarne linie.

UWAGA: należy zachować ostrożność, aby upewnić się, że z mikroorganizmem nie jest usuwane podłoże agarowe.

- Mieszać lub worteksować zawiesinę, aż będzie jednorodna. Niektóre szczepy drożdży nie ulegają łatwej dyspersji w wodzie. Jeżeli worteksowanie nie daje jednorodnej zawiesiny, należy umożliwić zawiesinie osiadanie przez 10–15 minut i worteksować ponownie. Jeżeli zawiesina nadal ma zlepienia, należy umożliwić ich opadnięcie na dno próbki z próbką i użyć supernatantu do inokulacji panelu drożdży. Zmętnienie supernatantu musi odpowiadać wzorcowi zmętnienia drożdżowego MicroScan. Jeżeli tak nie jest, należy przenieść więcej wzrostu do wody inokulacyjnej i powtórzyć powyższą procedurę.

UWAGA: NIE pipetować zlepionych komórek do panelu drożdży.

Inokulacja panelu

- Opisać panel numerem próbki.
- Dodać 50 µL zawiesiny drożdży do każdej studzienki zawierającej substrat oraz studzienek kontrolnych BNAC i NPC. Nie jest zalecane stosowanie do inokulacji pipety Pasteura.

Tabela 1-1, Substraty

Substraty	Skrót	Substraty	Skrót
Hydroksyprolino-β-naftyloamid	HPR	L-histydyno-β-naftyloamid	HIS
L-izoleucyno-β-naftyloamid	ILE	Sukroza	SUC1
L-prolino-β-naftyloamid	PRO	Sukroza	SUC2 ¹
L-tyrozyno-β-naftyloamid	TYR	Trehaloza	TRE
Glicyno-β-naftyloamid	GLY	p-nitrofenylo-α-D-glukopiranozyd	AGL1
Glicyloglicyno-β-naftyloamid	GGLY	p-nitrofenylo-α-D-glukopiranozyd	AGL2 ¹
Glicylo-L-arginino-4-metoksy-β-naftyloamid	GLAR	p-nitrofenylo-β-D-glukopiranozyd	BGL
Glicylo-L-prolino-4-metoksy-β-naftyloamid	GLPR	o-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd	BGAL
L-arginylo-L-arginino-β-naftyloamid	AARG	p-nitrofenylo-β-D-fukopiranozyd	BDF
L-lizylo-L-alanino-4-metoksy-β-naftyloamid	LYAL	p-nitrofenylo-α-D-galaktopiranozyd	AGAL

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Substraty	Skrót	Substraty	Skrót
L-alanino-4-metoksy- β -naftyloamid	ALA	p-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-glukozaamina	NAG
L-serylo-L-tyrozyno- β -naftyloamid	STY	p-nitrofenylo- β -D-celobioza	CELL
Mocznik	URE	p-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-galaktozamina	NGAL
Fosforan 3-indoksylu	IDX		

1. Stosowane są różne preparaty tych samych substratów.

3. Po inokulacji panelu z 50 μ L inokulum, lekko postukać każdy z boków panelu, aby pomóc w wymieszaniu substratu.

UWAGA: jeżeli panel będzie odczytywany na urządzeniach WalkAway lub autoSCAN-4, należy również inokulować studzienkę LOC.

Inkubacja

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

Odczyt z paneli

1. 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.
2. Odczytać panele przy użyciu światła odbitego od białego tła.
3. Po 4 godzinach inkubacji do odpowiednich studzienek dodać odczynnik peptydazowy i wodorotlenek sodu (NaOH).

- A. Dodać **1 kroplę** odczynnika peptydazowego do studzienek BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY i HIS. Umożliwić rozwój reakcji barwnej przez co najmniej 30 sekund przed odczytaniem wyników. Wyniki muszą być zarejestrowane w ciągu 3 minut od dodania odczynnika. Obecność JAKIEGOKOLWIEK odcienia różowego lub czerwonego w roztworze w całości lub dowolnej części studzienki jest interpretowana jako wynik dodatni. Kolory powinny być porównywane ze studzienką BNAC. Niektóre studzienki mogą mieć ciemniejszą barwę pomarańczową niż studzienka BNAC. Powinny być one zarejestrowane jako ujemne. Reakcje są dodatnie tylko wtedy, jeżeli w roztworze występuje kolor różowy lub czerwony. Kolor w tych studzienkach z czasem pociemnieje. Ujemny kolor żółty może stać się ciemniejszym kolorem pomarańczowym. Należy to interpretować jako reakcja ujemna.

UWAGA: po dodaniu peptydazy do studzienki BNAC, powinna być ona żółta. Jeżeli występuje jakikolwiek odcień różowego lub czerwonego, nie należy stosować odczynnika peptydazowego.

- B. Dodać **1 kroplę** 0,05 N NaOH do studzienek AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL i NGAL. Poczekać co najmniej 5 sekund, ale nie dłużej niż 5 minut przed odczytaniem wyników. Każdy odcień żółtego należy rejestrować jako wynik dodatni. Porównać studzienki zawierające substrat ze studzienką NPC.

UWAGA: te studzienki mogą wyglądać na ciemniejsze niż studzienka NPC. Powinno być to interpretowane jako wynik ujemny, ale do uznania za wynik dodatni musi występować kolor żółty.

4. W celu ułatwienia interpretacji reakcji, dostarczono dwie studzienki kontroli.
 - A. BNAC = kontrola β -naftyloamidu. Po dodaniu odczynnika peptydazowego, studzienka ta będzie miała kolor żółty.
 - B. NPC = kontrola nitrofenylowa. Ta studzienka powinna być bezbarwna.
5. W celu interpretacji reakcji biochemicznych należy zapoznać się z rozdziałem WYNIKI.

UWAGA: analizator WalkAway odczytuje studzienki, które nie wymagają najpierw odczynników, aby zapobiec zaburzonym wynikom z powodu dymów odczynnika, które mogą być uwięzione pod pokrywą tacy i dlatego reakcje biochemiczne nie mogą być weryfikowane ręcznie.

WYNIKI

Interpretacje substratu

Well	Odczynnik	Dodatni	Ujemny
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Dodać 1 kroplę odczynnika peptydazowego. Umożliwić rozwój reakcji barwnej przez co najmniej 30 sekund, ale nie dłużej niż 3 min.	Jakikolwiek odcień różowego, czerwono-karminowego w roztworze ¹	Od żółtego do pomarańczowego
SUC1 SUC2 TRE		Dowolny odcień brązu lub żółci	Purpurowy
AGL1 BGL BGAL URE	Porównać ze studzienką kontroli NPC.	Dowolny odcień żółtego ²	Przezroczysty
IDX		Od różowego do karminowego	Od przezroczystego / beżowego do żółtego
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Dodać 1 kroplę 0,05 N NaOH. Poczekać co najmniej 5 sekund, ale nie dłużej niż 5 minut przed odczytaniem wyniku. Porównać ze studzienką kontroli NPC.	Dowolny odcień niebieskiego	Przezroczysty

1. Kolor dodatni może nie występować w całej studzienke.

2. W przypadku niektórych drożdży może być obecny kolor różowy. Należy to uznawać za reakcję dodatnią.

ZASADY REAKCJI IDENTYFIKACYJNYCH

Substraty β-naftyloamidowe aminokwasów (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - Gdy substrat jest hydrolizowany przez odpowiedni enzym (zazwyczaj aryloamidazę aminokwasową), uwalniana jest β-naftyloamina. β-naftyloamina jest wykrywana 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 aryloamidaza aminokwasowa. Określenie „aminopeptydaza” jest często stosowane jako synonim dla aryloamidazy, ale faktycznie oznacza enzym o innej swoistości (aminopeptydaza rozszczepia N-końcowy aminokwas peptydu). Aryloamidaza i aminopeptydaza mogą hydrolizować ten sam substrat β-naftyloamidu aminokwasu. Dlatego panel nie musi koniecznie oznaczać różnych i unikatowych enzymów. Pojedyncza aryloamidaza może hydrolizować kilka β-naftyloamidów aminokwasów.

Węglowodany (SUC1, SUC2, TRE) - Wykorzystanie sacharozy i trehalozy powoduje spadek pH wywołujący zmianę barwy czerwieni chlorofenolowej z purpurowej na żółtą. Te reakcje węglowodanów są selektywne i mogą nie odpowiadać reakcjom konwencjonalnym.

Substraty nitrofenylowe (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - Jeżeli obecny jest odpowiedni enzym, substrat jest rozszczepiany uwalniając orto- lub para-nitrofenol. W zasadowym pH związki te są żółte. Jeżeli reakcja zachodzi w kwaśnym pH, przed odczytaniem wyników po inkubacji należy dodać NaOH. Przed dodaniem wodorotlenku sodu studzienki mogą być bezbarwne lub bladożółte.

Fosfataza indoksylova (IDX) - fosforan indoksyłu jest rozszczepiany przez fosfatazę uwalniając indoksył. Indoksył łączy się z tlenem tworząc błękit indygo, który jest nierozpuszczalnym niebieskim lub niebiesko-szarym osadem.

Mocznik (URE) - mocznik jest rozszczepiany przez ureazę tworząc amoniak i ditlenek węgla. Amoniak (w postaci węglanu amonu) powoduje wzrost pH, co jest wykrywane przez czerwień fenolową zmieniającą kolor z żółtego na czerwony.

IDENTYFIKACJA MIKROORGANIZMU

Książka kodów szybkiego biotypu drożdży MicroScan służy do identyfikacji nieznanymi mikroorganizmów badanych. Ta książka kodów została wygenerowana z bazy danych MicroScan dla testów zawartych w panelu identyfikacji. Książka kodów drożdży opiera się na analizie komputerowej 27 testów w panelu do szybkiej identyfikacji drożdży. Wyniki testu są

przekształcane do 9-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 łącznej sumy ponad 99,9%.

Jeśli numer biotypu nie występuje w książce kodów, należy podejrzewać błąd procedury; na przykład dodano nieprawidłowy numer biotypu lub reakcja została błędnie zarejestrowana. Jeżeli numer biotypu jest prawidłowy, należy sprawdzić możliwość wymieszania hodowli i mikroorganizm 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 dostępnym na stronie internetowej Beckman Coulter lub z lokalnym dystrybutorem.

OGRANICZENIA METODY

1. Panele do szybkiej identyfikacji drożdży opracowano do identyfikacji drożdży i mikroorganizmów drożdżopodobnych (np. *Prototheca*). Należy zachować ostrożność w przypadku mikroorganizmów z nadmiernym wytwarzaniem strzępek grzybni.
2. Jeżeli dla określonego numeru biotypu ma być wymieniona identyfikacja więcej niż jednego związku, mogą być konieczne testy uzupełniające. Przyjęte procedury identyfikacji drożdży i mikroorganizmów drożdżopodobnych obejmują morfologię kolonii, wzrost w podwyższonej temperaturze i barwę na agarze fenolooksydazowym. Morfologia mikroskopowa na podłożu przeznaczonym do wywoływania typowej morfologii również może wspomóc identyfikację tych mikroorganizmów. Patrz odpowiednie referencyjne procedury mykologiczne.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Zmienność wyników chromogenicznych może być spowodowana nadmierną lub niedostateczną inokulacją systemu. Każde inokulum musi być porównane z wzorcem zmętnienia w celu osiągnięcia prawidłowego stężenia inokulum dla optymalnej wydajności.

KONTROLA JAKOŚCI

Dopuszczalność substratów identyfikacyjnych należy sprawdzać przez badanie mikroorganizmów za pomocą znanych reakcji. Wyniki dla każdej reakcji mikroorganizmów kontroli MicroScan znajdują się w tabeli kontroli jakości w niniejszym podręczniku.

Tabela kontroli jakości substratów do szybkiej identyfikacji drożdży

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefir</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Zacienione specyfikacje QC w tabeli powyżej zostaną wdrożone do wersji ≥ 1.90 oprogramowania LabPro.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Wynik dodatni można uzyskać przy użyciu *Rhodotulula rubra*, ATCC 66034.
3. Wynik ujemny można uzyskać przy użyciu *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Odczyty analizatora mogą wymagać weryfikacji wzrokowej.
5. Wynik dodatni można uzyskać przy użyciu *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Uwaga: mikroorganizmy służące do kontroli jakości są wybrane w celu zapewnienia dodatnich/ujemnych reakcji dla wszystkich substratów identyfikacyjnych. W związku z tym identyfikacje mikroorganizmów mogą różnić się od

przedstawionych w karcie kontroli jakości (QC). Dopuszczalność skuteczności produktu powinna być określana na podstawie porównania wyników testu, a nie identyfikacji.

WARUNKI GWARANCJI

System jest objęty gwarancją i podlega warunkom gwarancji zawartym w umowie dotyczącej systemu lub jego odczynników. Klient jest odpowiedzialny za przeprowadzanie procedur rutynowej konserwacji zapobiegawczej. Naprawy wynikające z nieprzeprowadzania tych procedur konserwacyjnych we wskazanych odstępach czasu firma Beckman Coulter wykonuje według własnego uznania i na koszt klienta.

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.
	Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa	Wskazuje kartę charakterystyki substancji.	ND.
	Made in USA	ND.	ND.
	Wyłącznie do zastosowania eksportowego	ND.	ND.
	Objętość do przygotowania	ND.	ND.

Legenda symboli			
Symbol	Nazwa symbolu	Opis normy	Standard
	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 효모 ID 절차 설명서

REF B1017-70

사용목적

신속 효모 동정 패널은 임상 표본에서 분리한 효모균 및 효모균과 유사한 종을 신속히 동정하도록 설계되었습니다.

요약 및 원리

임상 표본에서 분리한 효모균 중 동정에는 발색성 검사 및 수정된 기존 검사를 사용합니다. 신속 효모 동정 패널은 27개의 탈수 기질을 사용하는 96웰 미량희석 패널입니다(표 1-1 참조). 기질을 재수화하는 데는 가압 멸균수에 효모균을 매우 현탁시켜 사용합니다. 패널을 35~37°C에서 4시간 동안 배양한 뒤에 동정 결과를 얻습니다.

경고 및 주의 사항

1. 신속 효모 동정 패널은 ~~체~~/외 진단 용도로만 사용하십시오.
2. 펩티다아제 또는 수산화나트륨 시약이나 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 있음에 주의하십시오.
4. 모든 물질은 폐기하기 전에 가압 멸균해야 합니다.

보관

패널과 펩티다아제 시약을 2~8°C에 보관합니다.

GHS 유해물질 등급

유해물질로 분류되지 않음

SDS 안전보건자료는 techdocs.beckmancoulter.com에서 확인할 수 있습니다

검체 수집 및 준비

효모균의 권장 운송 및 분리 절차는 American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology¹(미국 미생물학 협회의 임상 미생물학 설명서) 또는 기타 균학 참조 설명서를 참조하십시오. 빠른 발색성 검사는 알지 못하는 균에 미리 형성된 효소가 있는지 여부를 확인합니다.^{2,3,4} 따라서 균이 증식하는 플레이팅 매체가 검사 결과에 영향을 미칩니다. 매체에 따라 다른 효소가 유도되기 때문입니다. 신속 효모 동정 패널은 사부로 덱스트로오스 한천(표준 또는 에몬스 수정)을 사용합니다. 증식 매체에 항생물질이 있는 것이 중요한 변수는 아니지만 혈액이 함유된 매체인 Yeast Extract-Malt Extract(YM) Agar와 Inhibitory Mold Agar(IMA)를 사용해서는 안 됩니다.

제공되는 품목

신속 효모 동정 패널(B1017-70)

워크시트

절차 설명서

정도관리 차트

필요하지만 제공되지 않는 품목

접종물(B1015-2)

0.05N 수산화나트륨(B1015-3)

펩티다아제 시약(B1012-30B)

효모 현탁도 표준(B1015-18)

커버 트레이(B1010-56B)

MicroScan 효모 바이오타입 코드 일람(B1014-1A)

접종 루프

사부로 덱스트로오스 한천 플레이트

Vortex 믹서

팁이 포함된 50 µL 피펫터

배양기(35-37°C), 비-CO₂

정도관리균:

Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

절차

패널 준비

1. 사용할 패널을 보관함에서 꺼내십시오. **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. 능동적으로 증식하는 균으로 신속 효모 동정 패널을 접종합니다. 충분히 증식되면 일차 분리 사부로 덱스트로오스 한천 플레이트의 집락을 사용할 수 있습니다. 필요한 경우, 사부로 덱스트로오스 한천 플레이트에 효모 분리주를 2차 배양하고 충분히 증식될 때까지 배양하십시오. 30°C에서는 48시간, 25°C(실온)에서는 48시간에서 72시간 배양하는 것을 권장합니다.

참고: 적절한 증식을 얻기 위해 추가 배양이 필요할 경우에만 30°C에서 48시간 이상 배양한 배양액을 사용해야 합니다.

2. 멸균 면봉이나 접종 루프를 사용하여 한천 플레이트에서 증식을 제거하고 접종물 3 mL(13 x 84 mm 또는 13 x 100 mm 튜브에 담은 가압 멸균 처리한 탈이온수)에 유화시킵니다. 각 현탁액은 MicroScan 효모균 혼탁도 표준과 비교했을 때 동일해야 합니다. 검사 접종물 현탁액과 효모균 혼탁도 표준과의 비교는 적절한 광원을 사용하여 대조되는 검은 선이 들어간 흰색 카드와 튜브를 비교하는 방법을 사용합니다.

참고: 균과 함께 한천 매체가 제거되지 않도록 주의하십시오.

3. 균질해질 때까지 현탁액을 섞거나 흔듭니다. 일부 효모 균주는 물에서 바로 섞이지 않습니다. 흔들었는데도 균질한 현탁액이 만들어지지 않으면 10~15분간 현탁액을 두었다가 다시 흔드십시오. 그래도 현탁액에 덩어리가 남아 있으면 튜브 아래로 덩어리를 가라앉히고 상청액을 사용하여 효모 패널을 접종하십시오. 상청액의 현탁도는 MicroScan 효모균 혼탁도 표준과 일치해야 합니다. 일치하지 않을 경우, 증식체를 접종물에 더 옮기고 위의 절차를 반복하십시오.

참고: 효모 패널에 세포 덩어리를 피펫으로 옮기지 마십시오.

패널 접종

1. 패널에 표본 번호를 붙입니다.
2. 기질이 포함된 각 웰과 콘트롤 웰 BNAC 및 NPC에 효모균 현탁액 50µL를 추가하십시오. 접종에는 파스퇴르 피펫을 사용하지 않는 것이 좋습니다.

표 1-1, 기질

기질	약어	기질	약어
히드록시프로린-β-나프틸아민	HPR	L-히스티딘-β-나프틸아민	HIS
L-이소류신-β-나프틸아민	ILE	수크로오스	SUC1
L-프롤린-β-나프틸아민	PRO	수크로오스	SUC2 ¹
L-타이로신-β-나프틸아민	TYR	트레할로스	TRE
글리신 β-나프틸아민	GLY	p-니트로페닐-α-D-글루코피라노시드	AGL1
글리실글리신-β-나프틸아민	GGLY	p-니트로페닐-α-D-글루코피라노시드	AGL2 ¹
글리실-L-아르기닌-4-메톡시-β-나프틸아민	GLAR	p-니트로페닐-β-D-글루코피라노시드	BGL
글리실-L-프롤린-4-메톡시-β-나프탈아민	GLPR	o-니트로페닐-β-D-갈락토피라노시드	BGAL
L-아르기닌-L-아르기닌-β-나프틸아민	AARG	p-니트로페닐-β-D-푸코피라노시드	BDF
L-리실-L-알라닌-4-메톡시-β-나프틸아민	LYAL	p-니트로페닐-α-D-갈락토피라노시드	AGAL
L-알라닌-4-메톡시-β-나프틸아민	ALA	p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사민	NAG
L-세릴-L-타이로신-β-나프틸아민	STY	p-니트로페닐-β-D-셀로비오스	CELL
요소	URE	p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-갈락토사미나이드	NGAL
3-인독실 인산염	IDX		

1. 동일 기질의 다른 형태를 사용합니다.

3. 패널을 50 µL 접종물로 접종한 후에 패널 양쪽을 가볍게 두드려 기질과 잘 섞이도록 합니다.

참고: 패널을 WalkAway 또는 autoSCAN-4에서 판독할 경우 LOC 웰도 접종해야 합니다.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

배양

1. 증발을 막기 위해 패널 위에 커버 트레이를 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 용해시켜야 합니다. 펩티다아제 시약은 결정형 침전물을 빠르게 재용해하기 위해 높은 온도에 노출하지 마십시오. 고온에 노출되면 시약이 분해됩니다.
2. 흰색 배경에 반사광을 비춰서 패널을 판독하십시오.
3. 4시간 배양한 후에 펩티다아제와 수산화나트륨(NaOH) 시약을 적절한 웰에 추가합니다.

- A. 펩티다아제 시약 **1방울**을 BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY 및 HIS 웰에 추가하십시오. 30초간 색상이 발현되기를 기다렸다가 결과를 기록합니다. 결과는 시약을 추가하고 3분 이내에 기록해야 합니다. 웰 전체 또는 일부에서 용액에 분홍색 또는 빨간색이 조금이라도 나타나면 양성으로 해석합니다. 색상은 BNAC 웰과 비교해야 합니다. 일부 웰은 BNAC 웰보다 어두운 주황색으로 보일 수 있습니다. 이 결과는 음성으로 기록해야 합니다. 용액에 분홍색 또는 빨간색이 나타날 때만 양성 반응입니다. 웰에 나타난 색은 시간이 지나면서 진해집니다. 음성 노란색이 어두운 주황색으로 바뀔 수 있습니다. 이는 음성 반응으로 해석해야 합니다.

참고: 펩티다아제를 BNAC 웰에 추가하면 노란색이 되어야 합니다. 분홍색이나 빨간색이 나타나면 펩티다아제 시약을 사용해서는 안 됩니다.

- B. 0.05N NaOH **1방울**을 AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL 및 NGAL 웰에 추가하십시오. 4초 이상, 5분 이내로 기다렸다가 결과를 기록합니다. 노란색은 색조를 불문하고 모두 양성으로 기록해야 합니다. 기질이 포함된 웰을 NPC 웰과 비교합니다.

참고: 이 웰은 NPC 웰보다 어두운 색이 나타날 수 있습니다. 이 결과는 음성으로 해석해야 하지만, 양성으로 간주하려면 노란색이 나타나야 합니다.

4. 두 개의 컨트롤 웰을 준비하여 반응 해석을 돕습니다.
 - A. BNAC = β -나프틸아민 정도관리물질. 펩티다아제 시약을 추가한 후에는 웰 색깔이 노란색이어야 합니다.
 - B. NPC = 니트로페닐 정도관리물질. 이 웰은 무색이어야 합니다.
5. 생화학적 판정에 대한 도움말은 결과 색션을 참조하십시오.

참고: WalkAway는 트레이 뚜껑에 시약 연무가 갇혀서 결과가 변경되지 않도록 시약이 필요하지 않은 웰을 먼저 판독하므로 생화학적 반응을 수동으로 검증할 수 없습니다.

결과 기질 해석

웰	시약	양성	음성
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	펩티다아제 시약 1방울을 추가하십시오. 색상 반응을 최소 30초 이상 일으키되, 3분을 넘기지 마십시오.	용액에 분홍색, 빨간색, 자주색, 계열 색상 발현 ¹	노란색 - 주황색
SUC1 SUC2 TRE		조금이라도 갈색 또는 노란색이 보임	보라색
AGL1 BGL BGAL	NPC 정도관리물질 웰과 비교합니다.	조금이라도 노란색이 보임 ²	투명
URE		분홍색에서 자주색	투명/베이지색에서 노란색
IDX		조금이라도 파란색이 보임	투명

웰	시약	양성	음성
AGL2	0.05 N NaOH 1방울을 첨가하십시오. 4초 이상, 5분	조금이라도 노란	투명
BDF	이내로 기다렸다가 결과를 기록합니다. NPC 정도관	색이 보임 ²	
AGAL	리물질 웰과 비교합니다.		
NAG			
CELL			
NGAL			

1. 전체 웰에 양성 색상이 나타나지 않을 수도 있습니다.
2. 일부 효모균은 분홍색이 나타날 수 있습니다. 이는 양성 반응으로 간주해야 합니다.

동정 반응 원리

아미노산 β-나프틸아민 기질(HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - 기질을 적절한 효소(일반적으로 아미노산 아릴아미다제)를 사용하여 가수분해하면 β-나프틸아민이 나옵니다. β-나프틸아민은 p-디메틸 아미노시남알데히드(펩티다아제 시약에 포함)를 첨가하여 검출하고, 이때 분홍색에서 보라색을 띠는 복합체가 생성됩니다.

참고: 아미노산 β-나프틸아민을 자르는 효소는 아미노산 아릴아미다제입니다. “아미노펩티다아제”라는 용어는 주로 아릴 아미다제의 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.

Carbohydrates (SUC1, SUC2, TRE) - 수크로오스와 트레할로오스를 사용하면 pH가 하락하고 클로로페놀 레드가 보라색에서 노란색으로 바뀝니다. 이 탄수화물 반응은 선택적이고 기존 반응과 일치하지 않을 수 있습니다.

니트로페닐 기질(AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - 적절한 효소가 있다면 기질이 쪼개져 오르토- 또는 파라-니트로페놀이 나옵니다. 알칼리 pH에서 이 복합체는 노란색입니다. 산성 pH에서 반응이 일어날 경우, 배양 후에 NaOH를 추가한 다음 결과를 판독해야 합니다. 수산화나트륨을 첨가하기 전에는 웰 색깔이 무색이거나 옅은 노란색일 수 있습니다.

인독실 인산염(IDX) - 인독실 인산염은 포스파타아제로 쪼개서 인독실을 내보냅니다. 인독실은 산소와 결합하여 남색을 형성합니다. 이는 파란색 또는 청회색 불용성 침전물이 됩니다.

요소(URE) - 요소는 우레아제로 쪼개서 암모니아와 이산화탄소를 형성합니다. 암모니아(탄산암모늄 형태)는 pH를 높이는 데, 이는 페놀 레드가 노란색에서 빨간색으로 바뀌는 것으로 검출합니다.

균 동정

MicroScan 신속 효모 바이오타입 코드 일람을 알 수 없는 검사 대상 균의 동정에 사용합니다. 이 코드 일람은 동정 패널에 포함된 검사를 위해 MicroScan의 데이터베이스에서 생성했습니다. 이 효모균 일람은 신속 효모 동정 패널을 사용한 27개 검사의 컴퓨터 분석 결과에 기초합니다. 검사 결과는 9자리 바이오타입 번호로 변환되며, 코드 일람에는 종 동정과 동정의 누적 상대 확률이 기재되어 있습니다. 가능한 모든 동정은 확률이 가장 높은 것에서부터 내림차순으로 인쇄되어 합산 확률이 총 99.9 %가 됩니다.

코드 일람에서 찾을 수 없는 바이오타입 번호가 나타날 경우, 먼저 절차에 오류가 있는지 의심해야 합니다. 예를 들어 바이오타입 번호가 잘못 추가되었거나 반응이 잘못 기록되었을 수 있습니다. 바이오타입 번호가 올바를 경우 배양액이 혼합되었는지 확인하고 세포 현탁액을 충분히 현탁하는 데 특별히 주의하여 균을 다시 검시해야 합니다. 재검 시 같은 결과가 나오면 Beckman Coulter 웹사이트의 Biotype Lookup Service를 이용하거나 현지 판매자에게 문의하십시오.

사용의 제약조건

1. 신속 효모 동정 패널은 효모균 및 효모균과 유사한 균(예: *Prototheca*)의 동정을 위해 설계되었습니다. 균사를 과도하게 생성하는 균은 주의를 기울여야 합니다.
2. 특정 바이오타입 번호에 2개 이상의 종 동정이 있을 경우 추가적인 검사가 필요할 수 있습니다. 효모균 및 효모균과 유사한 균에 허용되는 동정 절차에는 집락 형태 분석, 고온 증식, 색소 생성, 페놀옥시다아제 한천 등을 이용할 수 있습니다. 전형적 형태를 유도하기 위한 미세한 형태 분석도 이러한 균 동정에 도움이 될 수 있습니다. 적절한 균학 참조 절차를 참조하십시오.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. 시스템이 과도하거나 과소하게 접종되면 발색 결과에 차이가 생길 수 있습니다. 최적의 결과를 얻으려면 각 접종물은 현탁도 표준과 비교하여 접종물의 농도를 올바르게 맞춰야 합니다.

정도관리

알려진 반응으로 균을 검사하여 동정 기질의 수용 가능성을 확인해야 합니다. 권장 MicroScan 정도관리 균에 대한 각 반응 결과는 이 설명서의 Quality Control Chart에서 확인하십시오.

정도관리 차트 신속 효모 동정 기질

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

위의 표에 기록된 색상별 QC 규격은 LabPro 소프트웨어 ≥1.90 버전에 적용됩니다.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. *Rhodotulura rubra*, ATCC 66034로 양성 결과를 얻을 수 있습니다.
3. *Candida lusitanae*, ATCC 66035로 음성 결과를 얻을 수 있습니다.
4. 장비 판독 시에 육안 검사가 필요할 수 있습니다.
5. *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036으로 양성 결과를 얻을 수 있습니다.

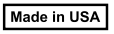
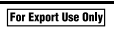
참고: 정도관리균은 모든 동정 기질에 양성/음성 반응을 제공하기 위해 선택됩니다. 따라서 균 동정은 QC 차트에 기재된 동정과 다를 수 있습니다. 제품 성능의 수용 가능성 여부는 동정이 아니라 검사 결과를 비교하여 결정해야 합니다.

품질 보증

이 시스템에는 시스템 또는 시약에 관한 계약에 포함된 보증 조항이 적용됩니다. 정기적인 예방적 유지보수 절차에 대한 책임은 고객에게 있습니다. 명시된 기간에 이러한 유지보수 절차를 수행하지 못해 발생하는 문제에 대한 수리는 Beckman Coulter의 재량에 따라 고객 부담으로 진행됩니다.

기호 목록

기호 목록			
기호	기호 제목	표준 설명	표준
	재사용 금지	일회용이거나 한 번 시술 시 한 명의 환자에만 사용 가능한 의료 기기를 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
	<n>회 검사에 충분한 양 포함	IVD로 수행 가능한 IVD 검사의 총 횟수를 나타냅니다. (일반적으로 시약 키트에 포함됨).	ISO 15223-1; 5.5.5

기호 목록			
기호	기호 제목	표준 설명	표준
	체/외 진단 의료 기기	체/외 진단용으로 사용되는 의료 기기임을 나타냅니다.	ISO 15223-1, 제 5.5.1 항
	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 Maya Tanımlama Prosedür Kılavuzu

REF B1017-70

KULLANIM AMACI

Hızlı Maya Tanımlama Paneli, klinik numunelerden izole edilen maya ve maya benzeri türlerin hızlı tanımlanması için tasarlanmıştır.

ÖZET VE PRENSİP

Kromojenik ve modifiye geleneksel testler, klinik numunelerden izole edilen maya türlerinin tanımlanması için kullanılır. Hızlı Maya Tanımlama Paneli, 27 dehidrasyon uygulanmış substratı kullanan 96 kuyucuklu bir mikrodilüsyon panelidir (Bkz. Tablo 1-1). Substratları rehidre etmek için otoklavlanmış suda mayanın ağır bir süspansiyonu kullanılır. Panelin 35-37°C'de 4 saat boyunca inkübasyonundan sonra bir tanımlama elde edilir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Hızlı Maya Tanımlama Panelleri yalnızca *in vitro* diagnostik kullanım içindir.
2. Peptidaz veya Sodyum Hidroksit reaktifinin 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 hassasiyet göstererek mikrobiyolojik tehlikelere yönelik aseptik tekniklere ve belirlenmiş önlemlere uyun.
4. Tüm materyaller atılmadan önce otoklavlanmalıdır.

SAKLAMA

Panelleri ve Peptidaz reaktifini 2-8°C'de saklayın.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Tehlikeli olarak sınıflandırılmamıştır

SDS Güvenlik Bilgi Formuna techdocs.beckmancoulter.com adresinden ulaşılabilir

NUMUNELERİN TOPLANMASI VE HAZIRLANMASI

Mayaların taşınması ve izolasyonunda önerilen prosedürler için American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology' (Amerikan Mikrobiyoloji Derneği Klinik Mikrobiyoloji Kılavuzu) veya diğer mikoloji başvuru kılavuzlarına bakın. Hızlı kromojenik testler bilinmeyen organizmada, önceden oluşmuş enzimlerin varlığına dayanmaktadır.^{2,3,4} Böylece, organizmanın ürettiği kaplama ortamı, farklı enzimlerin farklı ortamlarla indüksiyonu nedeniyle test sonuçlarını etkileyecektir. Hızlı Maya Tanımlama Paneli, Sabouraud Dekstroz Agar'ın (standart veya Emmons modifikasyonu) kullanımına dayanır. Üreme ortamında antibiyotiklerin varlığı kritik bir değişken değildir, ancak kan, Maya Ekstraktı-Malt Ekstraktı (YM) Agarı ve İnhibitör Küf Agarı (IMA) içeren ortam kullanılmamalıdır.

SAĞLANAN MALZEMELER

Hızlı Maya Tanımlama Panelleri (B1017-70)

Çalışma sayfası

Prosedür Kılavuzu

Kalite Kontrol Tablosu

GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

İnokülüm Suyu (B1015-2)

0,05 N Sodyum Hidroksit (B1015-3)

Peptidaz Reaktifi (B1012-30B)

Maya Türbidite standardı (B1015-18)

Panel Kapakları (B1010-56B)

MicroScan Maya Biyotip Kod Kitabı (B1014-1A)

İnokülasyon özeleri

Sabouraud Dekstroz Agar petrilere

Vorteks karıştırıcı

50 µL'lik uçlu pipetör

İnkübatör (35-37°C), CO₂'siz

Kalite kontrol organizmaları:

C29879-AB

Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROSEDÜR

Panellerin Hazırlanması

1. Kullanılacak panelleri saklama alanından 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. Hızlı Maya Tanımlama Panelini aktif olarak üreyen bir organizma ile inoküle edin. Yeterli üreme varsa, bir primer izolasyon Sabouraud Dekstroz Agar petrisindeki koloniler kullanılabilir. Gerekirse, Sabouraud Dekstroz Agar petrisi üzerinde maya izolatının alt kültürünü alın ve yeterli üreme gerçekleşene kadar inkübe edin. 30°C'de 48 saat veya 25°C'de 48 ila 72 saat (oda sıcaklığı) inkübasyon önerilir.

NOT: 30°C'de 48 saatten fazla inkübe edilen kültürler, yalnızca yeterli üreme elde etmek için ek inkübasyon gerekiyorsa kullanılmalıdır.

2. Steril bir temizleme çubuğu ya da inokülasyon özesi kullanarak, agar petrisindeki üremeyi çıkarın ve 3 mL İnokülüm Suyu (13 x 84 mm veya 13 x 100 mm tüpte otoklavlanmış deiyonize su) içinde emülsifiye edin. Her bir süspansiyon karşılaştırılmalı ve MicroScan Maya Türbidite Standardı ile eşdeğer olmalıdır. Test inokülüm süspansiyonunun Maya Türbidite Standardı ile karşılaştırılması, yeterli bir ışık kaynağı kullanarak ve tüpleri kontrast siyah çizgili beyaz bir kartla karşılaştırarak yapılmalıdır.

NOT: Organizmayla birlikte hiçbir agar besiyerinin ayrılmadığından emin olun.

3. Süspansiyonu homojen olana kadar karıştırın veya vorteksleyin. Bazı maya suşları suda kolayca dağılmaz. Vorteks işlemi homojen bir süspansiyonla sonuçlanmazsa, süspansiyonun 10-15 dakika beklemesini sağlayın ve yeniden vorteksleyin. Süspansiyonda hala topaklar varsa, topakların tüpün dibine inmesini bekleyin ve maya panelini inoküle etmek için üst fazı kullanın. Üst fazın türbiditesi, MicroScan Maya Türbidite Standardına uygun olmalıdır. Uygun değilse, İnokülüm Suyuna daha fazla üreme aktarın ve yukarıdaki prosedürü tekrarlayın.

NOT: Hücre topaklarını maya paneline PİPETLEMİYİN.

Panel İnokülasyonu

1. Paneli numune numarasıyla etiketleyin.
2. Substrat içeren her kuyucuğa, BNAC ve NPC kontrol kuyucuklarına 50 µL maya süspansiyonu ekleyin. İnokülasyon için Pasteur pipetinin kullanılması önerilmez.

Tablo 1-1, Substratlar

Substratlar	Kıs.	Substratlar	Kıs.
Hidroksiprolin-β-Naftilamid	HPR	L-Histidin-β-Naftilamid	HIS
L-İzolösin-β-Naftilamid	ILE	Sukroz	SUC1
L-Prolin-β-Naftilamid	PRO	Sukroz	SUC2 ¹
L-Tirozin-β-Naftilamid	TYR	Trehaloz	TRE
Glisin β-Naftilamid	GLY	p-Nitrofenil-α-D-Glukopiranozid	AGL1
Glisilglisine-β-Naftilamid	GGLY	p-Nitrofenil-α-D-Glukopiranozid	AGL2 ¹
Glisil-L-Arjinin-4-Metoksi-β-Naftilamid	GLAR	p-Nitrofenil-β-D-Glukopiranozid	BGL
Glisil-L-Prolin-4-Metoksi-β-Naftilamid	GLPR	o-Nitrofenil-β-D-Galaktopiranozid	BGAL
L-Arjinil-L-Arjinin-β-Naftilamid	AARG	p-Nitrofenil-β-D-Fukopiranozid	BDF
L-Lisil-L-Alanin-4-Metoksi-β-Naftilamid	LYAL	p-Nitrofenil-α-D-Galaktopiranozid	AGAL
L-Alanin-4-Metoksi-β-Naftilamid	ALA	p-Nitrofenil-N-Asetil-β-D-Glukozamin	NAG
L-Seril-L-Tirozin-β-Naftilamid	STY	p-Nitrofenil-β-D-Sellobioz	CELL
Üre	URE	p-Nitrofenil-N-Asetil-β-D-Galaktozaminid	NGAL
3-İndoksil Fosfat	IDX		

1. Aynı Substratların farklı formülasyonları kullanılır.

- Panel, 50 µL inokülüm ile inoküle edildikten sonra, substrat ile karışmasını sağlamak için panelin her iki tarafına hafifçe vurun.

NOT: Panel WalkAway veya autoSCAN-4'te okunacaksa LOC kuyucuğu da inoküle edilmelidir.

İnkübasyon

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

Panellerin Okunması

- 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.
- Beyaz bir arka plandan yansıyan ışığı kullanarak panelleri okuyun.
- 4 saat inkübasyondan sonra, uygun kuyucuklara Peptidaz ve Sodyum Hidroksit (NaOH) reaktiflerini ekleyin.

- BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY ve HIS kuyucuklarına **1 damla** Peptidaz reaktifi ilave edin. Sonuçları kaydetmeden önce 30 saniye boyunca rengin gelişmesini bekleyin. Sonuçlar, reaktif ilavesinden sonra 3 dakika içinde kaydedilmelidir. Kuyucuğun tamamında veya herhangi bir kısmında çözelti içinde HERHANGİ BİR pembe ya da kırmızı renk tonu olması, pozitif olarak yorumlanır. Renkler BNAC kuyucuğu ile karşılaştırılmalıdır. Bazı kuyucuklar BNAC kuyucuğundan daha koyu turuncu görünebilir. Bunlar negatif olarak kaydedilmelidir. Reaksiyonlar sadece çözelti içinde pembe veya kırmızı olması durumunda pozitifdir. Bu kuyucuklardaki renk zamanla koyulaşır. Negatif olan sarı renk daha koyu turuncu olabilir. Bu, negatif reaksiyon olarak yorumlanmalıdır.

NOT: BNAC kuyucuğuna Peptidaz eklendikten sonra, kuyucuk sarı olmalıdır. Herhangi bir pembe veya kırmızı varsa, Peptidaz reaktifi kullanılmamalıdır.

- AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL ve NGAL kuyucuklarına **1 damla** 0,05 N NaOH ekleyin. Sonuçları kaydetmeden önce, en az 5 saniye, en fazla 5 dakika bekleyin. Herhangi bir sarı tonu pozitif olarak kaydedilmelidir. Substrat içeren kuyucukları NPC kuyucuğu ile karşılaştırın.

NOT: Bu kuyucuklar NPC kuyucuğundan daha koyu görünebilir. Bu negatif olarak yorumlanmalıdır, ancak pozitif olarak değerlendirilmesi için sarı renk bulunmalıdır.

- Reaksiyonların yorumlanmasına yardımcı olmak için iki kontrol kuyucuğu temin edilmiştir.
 - BNAC=β-naftilamid kontrolü. Peptidaz reaktifi eklendikten sonra, bu kuyucuk sarı renkte olacaktır.
 - NPC=nitrofenil kontrolü. Bu kuyucuk renksiz olmalıdır.
- Biyokimyasal yorum konusunda yardım için SONUÇLAR bölümüne bakın.

NOT: WalkAway, tepsi kapağı altında sıkışabilecek reaktif dumanları nedeniyle sonuçların değişmesini önlemek için önce reaktif gerektirmeyen kuyucukları okur, bu nedenle biyokimyasal reaksiyonlar manuel olarak doğrulanamaz.

SONUÇLAR

Substrat Yorumlamaları

Well	Reaktif	Pozitif	Negatif
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	1 damla Peptidaz reaktifi ilave edin. En az 30 saniye ve en fazla 3 dakika boyunca renk reaksiyonunun gelişmesini bekleyin.	Çözelti içinde herhangi bir Pembe, Kırmızı ila Macenta tonu ¹	Sarı ila Turuncu
SUC1 SUC2 TRE		Herhangi bir Kahverengi veya Sarı tonu	Mor
AGL1 BGL BGAL	NPC kontrol kuyucuğuyla karşılaştırın.	Herhangi bir sarı tonu ²	Berrak
URE		Pembe ila Macenta	Berrak/Bej ila Sarı

Well	Reaktif	Pozitif	Negatif
IDX		Herhangi bir Mavi tonu	Berrak
AGL2	1 damla 0,05 N NaOH ekleyin. Sonucu kaydetmeden önce, en az 5 saniye, en fazla 5 dakika bekleyin. NPC kontrol kuyucuğuyla karşılaştırın.	Herhangi bir Sarı	Berrak
BDF		tonu ²	
AGAL			
NAG			
CELL			
NGAL			

1. Tüm kuyucuk boyunca pozitif bir renk bulunmayabilir.

2. Bazı mayalarda pembe bir renk bulunabilir. Bu, pozitif reaksiyon olarak kabul edilmelidir.

TANIMLAMA REAKSİYONLARININ PRENSİPLERİ

Amino asit β -naftilamid substratları (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) — Substrat uygun enzim tarafından hidrolize edildiğinde (genellikle bir amino asit arilamidaz), β -naftilamin serbest bırakılır. β -naftilamin, p-dimetilaminosinmaldehidin (Peptidaz reaktifinde) eklenmesiyle tespit edilir ve bu da pembe ile mor renkte bir kompleks oluşturur.

NOT: Amino asit β -naftilamidi ayıran enzim, amino asit arilamidazdır. “Aminopeptidaz” terimi, sıklıkla arilamidaz ile eş anlamlı olarak kullanılır, ancak aslında farklı özgülüklere 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.

Karbonhidratlar (SUC1, SUC2, TRE) — Sukroz ve trehaloz kullanımı, klorofenol kırmızısının mordan sarıya dönüşmesine neden olan bir pH düşüşüyle sonuçlanır. Bu karbonhidrat reaksiyonları seçicidir ve geleneksel reaksiyonlara uygun olmayabilir.

Nitrofenil Substratlar (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) — Uygun enzim varsa, substrat orto veya para nitrofenol bırakarak ayrılır. Bu bileşikler alkalın pH’ta sarıdır. Reaksiyon asidik bir pH’ta gerçekleşirse inkübasyondan sonra sonuçlar okunmadan önce NaOH eklenmelidir. Sodyum hidroksit eklenmeden önce kuyucukar renksiz veya soluk sarı olabilir.

İndoksil Fosfataz (IDX) — İndoksil fosfat, indoksili serbest bırakacak şekilde bir fosfataz tarafından ayrılır. İndoksil, çözünmeyen mavi veya mavi-gri çökelti olan indigo mavisi oluşturacak şekilde oksijenle birleştirir.

Üre (URE) — Üre, amonyak ve karbondioksit oluşturacak şekilde üreazdan ayrılır. Amonyak (amonyum karbonat şeklinde) pH’ta fenol kırmızısının sarıdan kırmızıya değişmesi ile tespit edilen bir artışa neden olur.

ORGANİZMA TANIMLAMASI

MicroScan Hızlı Maya Biyotip Kod Kitabı bilinmeyen test organizmalarının tanımlanması için kullanılır. Bu kod kitabı tanımlama panelinde bulunan testler için MicroScan’ın veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur. Maya Kod Kitabı, Hızlı Maya Tanımlama Panelindeki 27 testin bilgisayar analizine dayanmaktadır. Test sonuçları, kod kitabının bir tür tanımlamasını ve kümülatif bir göreceli tanımlama olasılığını listelediği 9 basamaklı bir biyotip numarasına dönüştürülür. Tüm olası tanımlamalar, %99,9’luk kümülatif toplama en yüksek olasılıktan başlayarak azalan sırada yazılmıştır.

Kod kitabında bulunamayan bir biyotip numarası mevcut olması durumunda ilk önce bir prosedür hatasından şüphelenilmelidir; örneğin, biyotip numarasının yanlış eklenmiş veya bir reaksiyonun hatalı bir şekilde kaydedilmiş olması. 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

- Hızlı Maya Tanımlama Panelleri, maya ve maya benzeri organizmaların (ör. *Prototheca*) tanımlanması için tasarlanmıştır. Aşırı hifal üretim olan organizmalara özen gösterilmelidir.
- Belirli bir biyotip numarası için birden fazla tür tanımlaması listeleniyorsa, ek testler gerekli olabilir. Maya ve maya benzeri organizmaların kabul edilen tanımlama prosedürleri arasında kolonyal morfoloji, yüksek sıcaklıkta üreme, fenoloksidaz agar üzerinde pigment oluşumu ve renk bulunur. Tipik morfolojiyi ortaya çıkarmak için tasarlanmış ortamdaki mikroskopik morfoloji de bu organizmaların tanımlanmasına yardımcı olabilir. Uygun mikoloji referans prosedürlerine bakın.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
- Kromojenik sonuçlardaki değişkenlik, sistemin aşırı veya yetersiz inokülasyonu nedeniyle oluşabilir. Optimum performans için doğru inokülüm konsantrasyonu elde etmek amacıyla her inokülüm, türbidite standardıyla karşılaştırılmalıdır.

KALİTE KONTROL

Tanımlama substratlarının kabul edilebilirliği reaksiyonları bilinen organizmalarının test edilmesi yoluyla kontrol edilmelidir. Önerilen MicroScan kontrol organizmaları için her bir reaksiyon sonucu, bu kılavuzda yer alan Kalite Kontrol Tablosunda bulunmaktadır.

Kalite Kontrol Tablosu Hızlı Maya Tanımlama Substratları

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefir</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Yukarıdaki tabloda gölgeli KK özellikleri LabPro ≥1.90 yazılım sürümlerinde uygulanacaktır.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034 ile pozitif sonuç elde edilebilir.
3. *Candida lusitanae*, ATCC 66035 ile negatif sonuç elde edilebilir.
4. Cihaz okumaları görsel doğrulama gerektirebilir.
5. *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036 ile pozitif sonuç elde edilebilir.

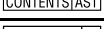
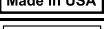
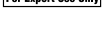
Not: Kalite Kontrol organizmaları tüm tanımlama substratları için pozitif/negatif reaksiyonlar sağlamak üzere seçilir. Bunun bir sonucu olarak, organizma tanımlamaları KK tablosunda belirtilenden farklı olabilir. Ürün performansının kabul edilebilirliği tanımlama ile değil test sonuçlarının karşılaştırılması ile belirlenmelidir.

GARANTİ BEYANI

Sistem veya reaktifler için yapılan sözleşmeniz dahilinde sistem, garanti hükümleri kapsamındadır ve bu hükümlere tabidir. Müşteri rutin koruyucu bakım prosedürlerini gerçekleştirmekten sorumludur. Belirtilen zaman aralıklarında bu bakım prosedürlerinin gerçekleştirilmemesi nedeniyle ortaya çıkan onarımlar, Beckman Coulter'ın kararına bağlı olarak ve masraflar müşteri tarafından karşılanacak şekilde yapılır.

Sembol Anahtarı

Sembol Anahtarı			
Sembol	Sembol Başlığı	Standardın Açıklaması	Standart
	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 kullanılamayacağı tarihi belirtir.	ISO 15223-1; 5.1.4
	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

Sembol Anahtarı			
Sembol	Sembol Başlığı	Standardın Açıklaması	Standart
	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 başvurma gerektğini 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 дрожжей

REF B1017-70

НАЗНАЧЕНИЕ

Панели для быстрой идентификации дрожжей предназначены для быстрой идентификации дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов, выделенных из клинических образцов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ

Для идентификации вида дрожжей, выделенных из клинических образцов, используются хромогенные или модифицированные стандартные тесты. Панель для быстрой идентификации дрожжей представляет собой 96-луночную панель для микроразведений, в которой используются 27 дегидратированных субстратов (см. таблицу 1–1). Для регидратации субстратов используют тяжелую дрожжевую суспензию в автоклавированной воде. Идентификацию проводят после инкубации планшета при температуре 35–37°C в течение 4 часов.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Панели для быстрой идентификации дрожжей предназначены только для *in vitro* диагностики.
2. Не допускайте попадания в глаза, на кожу или на одежду пептидазного реагента, гидроксида натрия, а также субстратов, используемых для идентификации.
3. При работе с представляющим опасность микробиологическим материалом соблюдайте правила асептики и установленные меры предосторожности при выполнении всех процедур, обращая 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

Рекомендуемые процедуры по транспортировке и выделению дрожжей приводятся в American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology (Руководство по клинической микробиологии Американского общества микробиологии)¹ или в других справочных руководствах по микологии. Быстрые хромогенные тесты основаны на присутствии готовых ферментов в неизвестном микроорганизме.^{2,3,4} Таким образом, питательная среда, используемая для роста микроорганизма, будет влиять на результаты теста, поскольку разные среды индуцируют различные ферменты. Работа с панелями для быстрой идентификации дрожжей основана на использовании декстрозного агара Сабуро (либо стандартного, либо в модификации Эммонса). Присутствие антибиотиков в питательной среде на результатах теста существенным образом не сказывается, однако не допускается использование сред, содержащих кровь, агар с солодово-дрожжевым экстрактом (YM) и ингибирующий плесневый агар (IMA).

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Панели для быстрой идентификации дрожжей (B1017-70)

Бланк регистрации

Практическое руководство

Таблица контроля качества

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Вода для инокуляции (B1015-2)

0,05 N раствор гидроксида натрия (B1015-3)

Пептидазный реагент (B1012-30B)

Дрожжевой стандарт мутности (B1015-18)

Лотки-крышки (B1010-56B)

Кодовая книга биотипов дрожжей MicroScan (B1014-1A)

Инокуляционные петли

Чашки с декстрозным агаром Сабуро

Вортекс

C29879–AB

Пипеттор 50 мкл с наконечниками

Инкубатор для температуры 35–37°C, без CO₂

Микроорганизмы для контроля качества:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

МЕТОДИКА

Подготовка панелей

1. Достаньте необходимые панели из места хранения. **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. Инокулируйте панель для быстрой идентификации дрожжей активным растущим микроорганизмом. В случае достаточного роста могут использоваться колонии из чашки с декстрозным агаром Сабуро для первичной изоляции. При необходимости проведите пересев изолята дрожжей на чашке с декстрозным агаром Сабуро и инкубируйте до тех пор, пока рост не станет достаточным. Рекомендуется инкубация в течение 48 часов при температуре 30°C или в течение 48–72 часов при температуре 25°C (комнатная температура).

ПРИМЕЧАНИЕ. Культуры, инкубированные в течение более чем 48 часов при температуре 30°C, следует использовать лишь в том случае, если для достижения достаточного роста требуется дополнительная инкубация.

2. С помощью стерильного тампона или петли для инокуляции отберите выросшие колонии из чашки с агаром и суспендируйте их в 3 мл воды для инокулята (автоклавированная деионизованная вода в пробирке 13 x 84 мм или 13 x 100 мм). Каждая суспензия должна сопоставляться с дрожжевым стандартом мутности MicroScan и иметь эквивалентную мутность. Сопоставление исследуемой суспензии инокулята с дрожжевым стандартом мутности следует проводить с использованием соответствующего источника освещения и при сравнении пробирок на фоне белой карточки с нанесенными контрастными черными линиями.

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте захвата среды агара при отборе микроорганизма.

3. Перемешайте суспензию вручную или на мешалке до однородности. Некоторые штаммы дрожжей плохо суспендируются в воде. Если перемешивание на мешалке не приводит к получению однородной суспензии, дайте суспензии постоять в течение 10–15 минут, а затем повторите перемешивание. Если и после этого в суспензии присутствуют сгустки, подождите, пока сгустки осядут на дно пробирки, а затем используйте надосадочную жидкость для инокуляции «дрожжевой» панели. Мутность надосадочной жидкости должна совпадать с мутностью дрожжевого стандарта MicroScan. Если мутность не совпадает, перенесите из чашки в воду для инокулята большее количество микроорганизмов и повторите процедуру, описанную выше.

ПРИМЕЧАНИЕ. НЕ допускается переносить пипеткой сгустки клеток в «дрожжевую» панель.

Инокуляция панели

1. Прикрепите к панели этикетку с номером образца.
2. В каждую лунку с субстратом и в две контрольные лунки (BNAC и NPC) добавьте по 50 мкл дрожжевой суспензии. Пастеровскую пипетку для инокуляции использовать не рекомендуется.

Таблица 1-1. Субстраты

Субстраты	Сокр.	Субстраты	Сокр.
Гидроксипролин-β-нафтиламид	HPR	L-гистидин-β-нафтиламид	HIS
L-изолейцин-β-нафтиламид	ILE	Сахароза	SUC1
L-пролин-β-нафтиламид	PRO	Сахароза	SUC2 ¹
L-тирозин-β-нафтиламид	TYR	Трералоза	TRE

*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Субстраты	Сокр.	Субстраты	Сокр.
Глицин β-нафтиламид	GLY	п-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид	AGL1
Глицилглицин-β-нафтиламид	GGLY	п-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид	AGL2 ¹
Глицил-L-аргинин-4-метокси-β-нафтиламид	GLAR	п-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	BGL
Глицил-L-пролин-4-метокси-β-нафтиламид	GLPR	о-Нитрофенил-β-D-галактопиранозид	BGAL
L-аргинил-L-аргинин-β-нафтиламид	AARG	п-нитрофенил-β-D-фукопиранозид	BDF
L-лизил-L-аланин-4-метокси-β-нафтиламид	LYAL	п-нитрофенил-α-D-галактопиранозид	AGAL
L-аланил-4-метокси-β-нафтиламид	ALA	п-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозамин	NAG
L-серил-L-тирозин-β-нафтиламид	STY	п-нитрофенил-β-D-целлобиоза	CELL
Мочевина	URE	п-нитрофенил-N-ацетил-β-D-галактозамин	NGAL
3-индоксилфосфат	IDX		

1. Используются разные формы выпуска одних и тех же субстратов.

- После инокуляции каждой лунки панели 50 мкл инокулята слегка постучите пальцами по каждой стороне панели для обеспечения перемешивания инокулята с субстратом.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если панель считывается с помощью приборов WalkAway или autoSCAN-4, необходимо также инокулировать лунку LOC.

Инкубация

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

Считывание данных с планшетов

- 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.
- Выполните считывание панелей в отраженном свете на белом фоне.
- После инкубации в течение 4 часов добавьте пептидазный реагент и раствор гидроксида натрия (NaOH) в соответствующие лунки.

- Добавьте по **1 капле** пептидажного реагента в лунки BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY и HIS. Подождите не менее 30 секунд до развития цветной реакции, после чего зарегистрируйте результаты. Результаты должны регистрироваться в течение 3 минут после добавления реагента. Наличие во всей лунке или в части лунки ЛЮБОГО оттенка розового или красного цвета интерпретируется как положительный результат. Цвет следует сравнивать с цветом лунки BNAC. Некоторые лунки могут иметь более интенсивную оранжевую окраску по сравнению с лункой BNAC. Для таких лунок необходимо зарегистрировать отрицательный результат. Реакции являются положительными лишь в том случае, если раствор окрашен в розовый или красный цвет. Со временем цвет в этих лунках становится более темным. Отрицательная желтая окраска может перейти в более темный оранжевый цвет. Это необходимо интерпретировать как отрицательную реакцию.

ПРИМЕЧАНИЕ. После добавления пептидазы в лунку BNAC лунка должна быть желтой. Не используйте пептидазный реагент при появлении розовой или красной окраски.

- В лунки AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL и NGAL добавьте по **1 капле** 0,05 N раствора NaOH. Подождите по крайней мере 5 секунд (но не более 5 минут), после чего зарегистрируйте результаты. Любой оттенок желтого цвета следует регистрировать как положительную реакцию. Сравните лунки, содержащие субстрат, с лункой NPC.

ПРИМЕЧАНИЕ. Лунки с субстратом могут казаться темнее, чем лунка NPC. Это следует интерпретировать как отрицательную реакцию. Чтобы считать реакцию положительной, в лунках должно присутствовать желтое окрашивание.

- Для облегчения интерпретации результатов в планшет включены две контрольные лунки.
 - BNAC = контроль с β-нафтиламидом. После добавления пептидажного реагента цвет этой лунки должен стать желтым.
 - NPC — контроль с нитрофениловым реагентом. Эта лунка должна быть бесцветной.
- Информация по интерпретации результатов биохимических реакций приводится в разделе «РЕЗУЛЬТАТЫ».

ПРИМЕЧАНИЕ. Система WalkAway в первую очередь считывает лунки, в которые не требуется добавление реагентов, для предотвращения искажения результатов вследствие скопления паров реагентов, удерживаемых под крышкой панели. Таким образом, биохимические реакции не могут подтверждаться вручную.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интерпретация результатов для субстратов

Лунка	Реагент	Положительный	Отрицательный
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Добавьте 1 каплю пептидазного реагента. Подождите не менее 30 секунд (но не более 3 минут) до развития цветной реакции.	Любой оттенок розового, от красного до пурпурного цвета в растворе ¹	От желтого до оранжевого
SUC1 SUC2 TRE		Любой оттенок коричневого или желтого	Лиловый
AGL1 BGL BGAL	Сравните с контрольной лункой NPC.	Любой оттенок желтого ²	Прозрачный
URE		От розового до пурпурного	Прозрачный (бесцветный) / от бежевого до желтого
IDX		Любой оттенок синего	Прозрачный
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Добавьте 1 каплю 0,05 N раствора NaOH. Подождите по крайней мере 5 секунд (но не более 5 минут), после чего зарегистрируйте результат. Сравните с контрольной лункой NPC.	Любой оттенок желтого ²	Прозрачный

1. Положительная окраска может присутствовать не во всей лунке.

2. С некоторыми дрожжами может появляться розовый цвет. Это следует считать положительной реакцией.

ПРИНЦИПЫ РЕАКЦИЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

β-нафтиламиды аминокислот в качестве субстратов (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) — 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 возможно установление различных и индивидуальных ферментов. Одна и та же ариламидаза может гидролизовать β-нафтиламиды нескольких аминокислот.

Углеводы (SUC1, SUC2, TRE) — утилизация сахарозы и трегалозы приводит к снижению pH, которое вызывает изменение окраски хлорфенолового красного с фиолетовой на желтую. Эти реакции на углеводы избирательны и могут не соответствовать стандартным реакциям.

Нитрофенильные субстраты (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) — в присутствии соответствующего фермента субстрат расщепляется с высвобождением свободного о- или п-нитрофенола. При щелочном pH эти соединения окрашены в желтый цвет. Если реакция происходит при кислотном pH, после инкубации

перед считыванием в лунку необходимо добавить раствор NaOH. До добавления раствора гидроксида натрия лунки могут быть бесцветными или бледно-желтыми.

Индоксилфосфатаза (IDX) — индоксилфосфат под действием фосфатазы расщепляется с высвобождением индоксила. Индоксил присоединяет кислород с образованием красителя «индиго синий», который представляет собой нерастворимый осадок синего или сине-серого цвета.

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для идентификации неизвестных исследуемых микроорганизмов используют кодовую книгу MicroScan для быстрого определения биотипа дрожжей. Эта кодовая книга создана на основе базы данных MicroScan для тестов, включенных в панель для идентификации. Кодовая книга для быстрого определения дрожжей основана на компьютерном анализе 27 тестов, включенных в панель для быстрой идентификации дрожжей. Результаты теста преобразуются в 9-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 наиболее высокой; при этом совокупная вероятность составляет 99,9%.

Если номер биотипа в кодовой книге отсутствует, прежде всего подозревается ошибка при проведении процедуры, например, с ошибкой введен номер биотипа или была зарегистрирована ошибочная реакция. 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. Панели для быстрой идентификации дрожжей предназначены для идентификации дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов (например, *Prototheca*). Следует соблюдать осторожность в случае микроорганизмов с повышенной выработкой гифов.
2. Если для определенного номера биотипа в списке идентифицированных видов указано более одного наименования, могут потребоваться дополнительные тесты. Общепринятые методы для идентификации дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов включают исследование морфологии колоний, рост культуры при повышенной температуре, а также образование пигмента и окрашивание на агаре с фенолоксидазой. Для идентификации этих микроорганизмов также могут использоваться микроскопические исследования морфологии колоний на средах, разработанных для роста колоний с типичной морфологией. См. соответствующие справочные руководства по микологии.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Результаты хромогенных тестов могут различаться по причине избыточной или недостаточной инокуляции системы. Для оптимальных результатов мутность каждого инокулята должна сопоставляться со стандартом мутности с целью достижения правильной концентрации инокулята.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Пригодность субстратов, используемых для идентификации, следует проверять путем тестирования микроорганизмов в известных реакциях. Результаты для каждой реакции для рекомендуемых контрольных микроорганизмов MicroScan находятся в таблице контроля качества данного руководства.

Таблица контроля качества субстратов для быстрой идентификации дрожжей

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
SUC1	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
SUC2	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
TRE	-	✓	✓	✓	✓	+	✓
AGL1	-	✓	+	✓	✓	✓	✓
BGL	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
BGAL	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
AGL2	✓	-	✓	+	✓	✓	✓
BDF	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
AGAL ⁵	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NAG	✓	-	✓	✓	+	✓	✓
CELL	-	✓	✓	+	✓	✓	✓
NGAL	+	-	✓	✓	✓	✓	✓

Спецификации контроля качества, выделенные в таблице выше затенением, используются в программном обеспечении LabPro в версиях ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

2. Положительный результат может быть получен с использованием *Rhodotulula rubra*, ATCC 66034.

3. Отрицательный результат может быть получен с использованием *Candida lusitanae*, ATCC 66035.

4. При считываниях на приборе может потребоваться визуальная проверка.

5. Положительный результат может быть получен с использованием *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Примечание. Контрольные микроорганизмы выбираются для обеспечения положительных/отрицательных реакций для всех субстратов для идентификации. В результате этого идентификация микроорганизма может отличаться от идентификации, указанной в таблице контроля качества. Приемлемость рабочих характеристик изделия должна определяться путем сравнения результатов тестов, но не данных по идентификации.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

На систему распространяются положения гарантии, включенной в договор на систему или реагенты для нее. Покупатель несет ответственность за проведение планового профилактического технического обслуживания. Проведение ремонтных работ, являющихся следствием невыполнения такого технического обслуживания в установленные временные интервалы, осуществляется по усмотрению Beckman Coulter и за счет покупателя.

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
	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/ЕЕС.	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

Ключ символов

Символ	Название символа	Описание стандарта	Стандарт
	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 in vitro	Обозначает медицинское изделие, предназначенное для использования при диагностике in vitro.	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 Инструкции 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
	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

Процедурно ръководство за бърза идентификация на дрожди

REF B1017-70

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Панелът за бърза идентификация на дрожди е предназначен за бързо идентифициране на дрожди и видове, подобни на дрожди, изолирани от клинични образци.

ОБОБЩЕНИЕ И ПРИНЦИП

Хромогенни и модифицирани конвенционални тестове се използват за идентифициране на видове дрожди, изолирани от клинични образци. Панелът за бърза идентификация на дрожди е панел за микроразреждания с 96 ямки, които използват 27 дехидратирани субстрата (Вижте Таблица 1-1). Плътна суспензия на дрожди в автоклавирана вода се използва за рехидратиране на субстратите. Идентификацията се получава след инкубиране на панела при температура 35–37°C в продължение на 4 часа.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Панелите за бърза идентификация на дрожди са само за *in vitro* диагностика.
2. Не допускайте реактивите за пептидаза или натриев хидроксид или някой от идентификационните субстрати да влизат в контакт с очи, кожа или дрехи.
3. Съблюдавайте асептични техники и установените предпазни мерки срещу микробиологични опасности по време на всички процедури, като обърнете внимание, че инокулираните панели съдържат потенциални патогенни организми.
4. Всички материали трябва да бъдат автоклавираны, преди да бъдат изхвърлени.

СЪХРАНЕНИЕ

Съхранявайте панелите и реактива за пептидаза при температури 2–8°C.

КЛАСИФИЦИРАНЕ НА ОПАСНОСТИТЕ ПО ГЛОБАЛНАТА ХАРМОНИЗИРАНА СИСТЕМА (GHS)

Не е класифициран като опасен



Информационният лист за безопасност е наличен на адрес
techdocs.beckmancoulter.com

ВЗИМАНЕ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА ЗА АНАЛИЗ

Вижте American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology¹ (Ръководството по клинична микробиология на Американското общество по микробиология) или друго ръководство за справка по микология за препоръчителни процедури за транспортиране и изолиране на дрожди. Бързите хромогенни тестове се базират върху наличието на предварително образувани ензими в неизвестния организъм.^{2,3,4} По този начин средата за плаки, върху която се отглежда организмът, ще повлияе на резултатите от теста поради индуцирането на различни ензими от различни среди. Панелът за бърза идентификация на дрожди се базира върху използването на агар Сабуру с декстроза (стандартен или вариант на Емонс). Наличието на антибиотици в средата за растеж не е критична променлива, но все пак среда, съдържаща кръв, екстракт от дрожди-малцов екстракт (YM) агар или агар, инхибиращ плесени (IMA), не трябва да се използва.

ПРЕДОСТАВЕНИ МАТЕРИАЛИ

Панели за бърза идентификация на дрожди (B1017-70)

Работен журнал

Процедурно ръководство

Диаграма за контрол на качеството

НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРЕДОСТАВЕНИ МАТЕРИАЛИ

Инокулумна вода (B1015-2)

Натриев хидроксид 0,05 N (B1015-3)

Реактив за пептидаза (B1012-30B)

Стандарт за мътност на дрожди (B1015-18)

Поставки с капак (B1010-56B)

Книга с кодове за биотипи на дрожди на MicroScan (B1014-1A)

Инокулационни примки

Плаки с агар Сабуру с декстроза

Въртящ миксер

50 µL пипетор с крайници

Инкубатор (35–37°C), в който не се използва CO₂

Организми за контрол на качеството:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

ПРОЦЕДУРА

Приготвяне на панели

1. Извадете панелите, които ще бъдат използвани, от мястото за съхранение. **Панелите не трябва да се използват, ако няма десикант или са счупени или ако целостта на опаковката е компрометирана (незапечатана, пробита или разкъсана).**
2. Разрежете плика и извадете панела. Извадете незабавно панела от фолиевия плик. Изчакайте панелите да достигнат стайна температура преди рехидратиране. Панелите могат да бъдат подредени един върху друг с поставена върху тях чиста покривна поставка.

Подготвяне на инокулум

1. Инокулирайте панела за бърза идентификация на дрожди с активно развиващ се организъм. Колонии от плаката с агар Сабуро с декстроза на първичния изолат може да се използват, ако има наличие на достатъчен растеж. Ако е необходимо, субкултурирайте дрождевия изолат върху плаки с агар Сабуро с декстроза и инокулирайте, докато не настъпи достатъчен растеж. Препоръчва се инкубация за 48 часа при температура 30°C или за 48 до 72 часа при температура 25°C (стайна температура).

ЗАБЕЛЕЖКА: Култури, инокуирани повече от 48 часа при температура 30°C, трябва да се използват само ако се изисква допълнително инкубиране, за да се получи адекватен растеж.

2. Като използвате стерилен тампон или инокулационна примка, отстранете растежа от агарната плака и емулгирайте в 3 mL вода за инокулация (автоклавирана дейонизирана вода в 13 x 84 mm или 13 x 100 mm епруветка). Всяка суспензия трябва да бъде сравнена и да бъде еквивалентна на стандарт за мътност за дрожди MicroScan. Сравняването с тестовата инокулумна суспензия и стандарта за мътност за дрожди трябва да бъде направено чрез подходящ светлинен източник и чрез сравняване на епруветки с бяла карта с контрастни черни линии.

ЗАБЕЛЕЖКА: Погрижете се да не се отстрани агарна среда с организма.

3. Смесете или използвайте обръщане за суспензията, докато не се хомогенизира. Някои щамове дрожди не се дисперсират лесно във вода. Ако след обръщане не се получи хомогенна суспензия, оставете суспензията да постои 10–15 минути и след това обърнете повторно. Ако в суспензията все още има бучки, оставете бучките да се утаят на дъното на епруветката и използвайте супернатанта, за да инокулирате панела за дрожди. Мътността на супернатанта трябва да съответства на стандарта за мътност за дрожди MicroScan. Ако не съответства, прехвърлете още развити организми във вода за инокулация и повторете горната процедура.

ЗАБЕЛЕЖКА: НЕ пипетирайте бучките от клетки в панела за дрожди.

Инокулиране на панел

1. Поставете етикет на панела с номера на образеца.
2. Добавете 50 µL суспензия на дрожди към всяка ямка, съдържаща субстрат, и към контролните ямки VNAC и NPC. Употребата на пипета на Пастьор за инокулиране не се препоръчва.

Таблица 1-1, Субстрати

Субстрати	Съкр.	Субстрати	Съкр.
Хидроксипролин-β-нафтиламид	HPR	L-хистидин-β-нафтиламид	HIS
L-изолевцин-β-нафтиламид	ILE	Захароза	SUC1
L-пролин-β-нафтиламид	PRO	Захароза	SUC2 ¹
L-тирозин-β-нафтиламид	TYR	Трехалоза	TRE
Глицин β-нафтиламид	GLY	p-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид	AGL1

*American Type Culture Collection, Манасас, Вирджиния, САЩ

Субстрати	Съкр.	Субстрати	Съкр.
Глицилглицин-β-нафтиламид	GGLY	p-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид	AGL2 ¹
Глицил- L-аргинин-4-метокси-β-нафтиламид	GLAR	p-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	BGL
Глицил-L-пролин-4-метокси-β-нафтиламид	GLPR	o-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	BGAL
L-аргинил-L-аргинин-β-нафтиламид	AARG	p-нитрофенил-β-D-фукопиранозид	BDF
L-лизил-L-аланин-4-метокси-β-нафтиламид	LYAL	p-нитрофенил-α-D-галактопиранозид	AGAL
L-аланин-4-метокси-β-нафтиламид	ALA	p-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозамин	NAG
L-серил-L-тирозин-β-нафтиламид	STY	p-нитрофенил-β-D-целобиоза	CELL
Урея	URE	p-нитрофенил-N-ацетил-β-D-галактозаминид	NGAL
3-индоксил фосфат	IDX		

1. Използват се различни рецептури на едни и същи субстрати.

- След инокулиране на панела с 50 µL инокулум, леко потупайте всяка страна на панела, за да се осигури смесване със субстрата.

ЗАБЕЛЕЖКА: Ако панелът ще се отчита на WalkAway или autoSCAN-4, ямката LOC също трябва да бъде инокулирана.

Инкубация

- Подредете панелите в групи от 3 до 5 с поставена покривна поставка на най-горния панел, за да се предотврати изпаряване.
- Инкубирайте инокулираните панели в продължение на 4 часа при температура 35–37°C в инкубатор, в който не се използва CO₂.

Отчитане на панелите

- Извадете реактива за пептидаза от хладилника поне 30 минути преди отчитане на панелите. Реактивът за пептидаза може да се утаи при 4°C, но ще се разтвори отново при стайна температура. Не излагайте реактив за пептидаза на повишени температури, за да ускорите повторното разтваряне на кристалната утайка, тъй като високите температури ще доведат до разрушаване на реактива.
- Отчетете панелите, като използвате отразена светлина от бял фон.
- След 4 часа инкубиране добавете реактиви за пептидаза и натриев хидроксид (NaOH) към подходящите ямки.

- Добавете **1 капка** реактив за пептидаза към ямките BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY и HIS. Изчакайте 30 секунди да се развие цветът, преди да регистрирате резултатите. Резултатите трябва да се регистрират в рамките на 3 минути след добавянето на реактива. Наличието на КАКЪВТО И ДА Е нюанс на розово или червено в разтвора в цялата ямка или в част от ямката се интерпретира като положителен резултат. Цветовете трябва да се сравняват с ямката BNAC. Някои ямки може да проявяват по-тъмно оранжев цвят от този на ямката BNAC. Те трябва да бъдат регистрирани като отрицателни. Реакциите са положителни само ако има наличие на розово или червено в разтвора. Цветът в тези ямки ще потъмнява с времето. Отрицателен жълт цвят може да стане по-тъмно оранжев цвят. Това трябва да се интерпретира като отрицателна реакция.

ЗАБЕЛЕЖКА: След добавяне на пептидаза към ямката BNAC, тя трябва да стане жълта. Ако има розов или червен цвят, реактивът за пептидаза не трябва да се използва.

- Добавете **1 капка** 0,05 N NaOH към ямки AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL и NGAL. Изчакайте поне 5 секунди, но не повече от 5 минути, преди да регистрирате резултатите. Всеки нюанс на жълтото трябва да се регистрира като положителен резултат. Сравнете ямките, съдържащи субстрат, с ямката NPC.

ЗАБЕЛЕЖКА: Тези ямки може да се проявят в по-тъмен цвят от този на ямката NPC. Това трябва да се интерпретира като отрицателен резултат, но при наличие на жълт цвят трябва да се разглежда като положителен резултат.

- Контролните ямки са предвидени за подпомагане на интерпретирането на реакциите.
 - BNAC = β-нафтиламид контрол. След добавяне на реактив за пептидаза тази ямка ще бъде в жълт цвят.
 - NPC = нитрофенилова контрола. Тази ямка трябва да бъде безцветна.
- Вижте раздела РЕЗУЛТАТИ за помощ при интерпретиране на биохимичните тестове.

ЗАБЕЛЕЖКА: WalkAway отчита първо ямки, които не изискват реактиви, за да се предотвратят променени резултати поради парите на реактива, които може да се уловят под капака на поставката, поради това биохимичните реакции не могат да бъдат верифицирани ръчно.

РЕЗУЛТАТИ

Интерпретации на субстратите

Вдлъбнатина	Реагент	Положителен	Отрицателен
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Добавете 1 капка реактив за пептидаза. Изчакайте поне 30 секунди, за да се развие цветна реакция, но не по-дълго от 3 минути.	Всеки нюанс на розово, червено до магента в разтвора ¹	Жълт до оранжев
SUC1 SUC2 TRE		Всеки нюанс на кафяво или жълто	Лилав
AGL1 BGL BGAL	Сравнете контролната ямка с NPC.	Всеки нюанс на жълто ²	Прозрачен
URE		Розов до магента	Прозрачно/бежово до жълто
IDX		Всеки нюанс на синьото	Прозрачен
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Добавете 1 капка 0,05 N NaOH. Изчакайте поне 5 секунди, но не повече от 5 минути, преди да регистрирате резултата. Сравнете контролната ямка с NPC.	Всеки нюанс на жълто ²	Прозрачен

1. Възможно е положителен цвят да не присъства в цялата ямка.

2. Розов цвят може да се получи при някои дрожди. Това трябва да се счита за положителна реакция.

ПРИНЦИПИ НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Аминокиселинни β -нафтиламидни субстрати (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Когато субстратът е хидролизиран чрез подходящ ензим (обикновено аминокиселинна ариламидаза) се освобождава β -нафтиламин. β -нафтиламинът се открива чрез добавяне на р-диметиламиноцинамалдехид (в реактива за пептидаза), който създава комплекс с розов до пурпурен цвят.

ЗАБЕЛЕЖКА: Ензимът, който разкъсва β -нафтиламид на аминокиселина, е ариламидаза на аминокиселина. Терминът „аминопептидаза“ често се използва като синоним на ариламидаза, но в действителност представлява ензим с различна специфичност (аминопептидазата разкъсва N-крайната аминокиселина от пептид). Ариламидаза и аминопептидаза могат да хидролизират един и същ аминокиселинен β -нафтиламиден субстрат. Следователно панелът не измерва непременно различни и уникални ензими. Една ариламидаза може да хидролизира няколко β -нафтиламиди на аминокиселина.

Въглехидрати (SUC1, SUC2, TRE) – Употребата на захароза и трехалоза води до понижаване на pH, което причинява промяна на хлорфеноловото червено от лилаво в жълто. Тези реакции с въглехидрати са селективни и може би няма да съответстват на конвенционални реакции.

Нитрофенилови субстрати (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Ако има наличие на подходящ ензим, субстратът се разкъсва, като освобождава орто- или паранитрофенол. При алкално pH тези съединения са жълти. Ако възникне реакция при киселинно pH, след инкубиране, преди да могат да се отчетат резултатите, трябва да се добави NaOH. Ямките могат да бъдат или безцветни, или бледожълти, преди да се добави натриевият хидроксид.

Индоксил фосфатаза (IDX) – Индоксил фосфат се разделя от фосфатаза за освобождаване на индоксил. Индоксилът се комбинира с кислород за образуване на индиговосиньо, което е неразтворима синя или синьо-сива утайка.

Уреа (URE) – Уреата се разделя от уреазата за образуване на амониак и въглероден диоксид. Амониакът (под формата на амониев карбонат) води до повишаване в pH, което се отчита чрез фенолово червено, променящо се от жълто в червено.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ОРГАНИЗМИ

Книгата с кодове за бързо определяне на биотип на дрожди на MicroScan се използва за идентификация на неизвестни тестови организми. Тази книга с кодове е генерирана от базата данни на MicroScan за тестовите,

включени в идентификационния панел. Книгата с кодове за дрожди е на базата на компютърен анализ на 27-те теста в панела за бърза идентификация на дрожди. Резултатите от теста са трансформирани в 9-цифрен номер на биотип, за който книгата с кодове включва идентификация на вид и кумулативна относителна вероятност за идентификация. Всички възможни идентификации са отпечатани в низходящ ред от най-високата вероятност до кумулативна обща вероятност 99,9 %.

Ако се получи номер на биотип, който не може да бъде открит в книгата с кодовете, първо трябва да се помисли за наличие на процедурна грешка – например номерът на биотип е бил добавен неправилно или погрешно е била регистрирана реакция. Ако номерът на биотипа е правилен, тогава трябва да се провери възможността за смесена култура и организъмът трябва да бъде повторно тестван, като специално се обърне внимание върху използването на клетъчна суспензия с достатъчна мътност. Ако при повторното тестване се получат същите резултати, свържете се с Biotype Lookup Service (Служба за откриване на биотипове) в уебсайта на Beckman Coulter или се консултирайте с местния дистрибутор.

ОГРАНИЧЕНИЕ НА ПРОЦЕДУРАТА

1. Панелите за бърза идентификация на дрожди са предназначени за идентификация на дрожди и дрождоподобни организми (напр. *Prototheca*). Трябва да се внимава с организми с прекомерно производство на хифи.
2. Ако за определен номер биотип ще бъде определяна идентификация на повече от един вид, може да са необходими допълнителни тестове. Възприетите процедури за идентификация на дрожди и дрождоподобни организми включват морфология на колонии, отглеждане при повишена температура, образуване на пигмент и цвят върху фенолоксидазен агар. Микроскопското морфологично определяне върху среда, предназначено за получаване на типична морфология, може също да помогне при идентификацията на тези организми. Вижте подходящи микологични референтни процедури.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Вариации в хромогенните резултати може да настъпи поради прекомерно или недостатъчно инокулиране на системата. Всеки инокулум трябва да бъде сравняван със стандарта за мътност, за да се получи правилна концентрация на инокулума за оптимална работа.

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Приемливостта на субстратите за идентификация трябва да бъде проверена чрез тестване на организми с известни реакции. Резултатите за всяка реакция за препоръчителните контролни организми MicroScan се установят в диаграмата за контрол на качеството.

Субстрати за бърза идентификация на дрожди в диаграма за контрол на качеството

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
ILE ²	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓
PRO	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
TYR	✓	✓	+	✓	-	✓	✓
GLY	✓	-	+	✓	✓	✓	✓
GGLY	✓	✓	+	✓	-	✓	✓
GLAR	+	✓	✓	✓	-	✓	✓
GLPR ³	✓	✓	+	✓	✓	✓	✓
AARG	-	✓	✓	+	✓	✓	✓
LYAL	-	✓	✓	✓	✓	✓	+
ALA	✓	✓	✓	✓	-	+	✓
STY	-	✓	✓	✓	✓	✓	+
URE	-	✓	✓	✓	+	✓	✓
IDX	✓	✓	+ ⁴	✓	-	✓	✓
HIS	✓	✓	✓	✓	-	+	✓
SUC1	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
SUC2	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
TRE	-	✓	✓	✓	✓	+	✓
AGL1	-	✓	+	✓	✓	✓	✓
BGL	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
BGAL	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
AGL2	✓	-	✓	+	✓	✓	✓
BDF	-	+	✓	✓	✓	✓	✓
AGAL ⁵	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NAG	✓	-	✓	✓	+	✓	✓
CELL	-	✓	✓	+	✓	✓	✓
NGAL	+	-	✓	✓	✓	✓	✓

Щрихованите спецификации за КК (качествен контрол) в горната таблица ще бъдат внедрени в софтуера LabPro, версии ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Манасас, Вирджиния, САЩ.

2. *C Rhodoturula rubra*, ATCC 66034, може да бъде получен положителен резултат.

3. С *Candida lusitanae*, ATCC 66035, може да бъде получен отрицателен резултат.
4. Отчитането на инструмента може да изисква визуална верификация.
5. С *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036, може да бъде получен положителен резултат.

Забележка: Организми за контрол на качеството се избират за осигуряване на положителна/отрицателна реакция за всички идентификационни субстрати. В резултат на това идентификацията на организма може да се различава от тази, посочена в диаграмата за КК (качествен контрол). Приемливостта на работните характеристики на продукта трябва да бъде определена чрез сравняване на резултатите от тест, не чрез идентификацията.

ГАРАНЦИОННО ОБСЛУЖВАНЕ

Системата се покрива от и се подчинява на клаузите за гаранция, включени във Вашето договорно споразумение за системата и нейните реактиви. Клиентът е отговорен за изпълнението на рутинни процедури за профилактика. Ремонти, наложени от неизпълнение на тези процедури за техническо обслужване в посочените интервали от време, се правят по усмотрение на Beckman Coulter и за сметка на клиента.

Легенда на символите

Легенда на символите			
Символ	Название на символа	Описание на стандарта	Стандарт
	Не използвайте повторно	Указва медицинско изделие, което е предназначено за една употреба или за употреба върху един пациент по време на еднократна процедура.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Срок на годност	Посочва датата, след която медицинското изделие не трябва да се използва.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Код на партида	Посочва кода на партидата на производителя, по който да може да се идентифицира партида.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Каталожен номер	Посочва каталожния номер на производителя, по който да може да се идентифицира медицинското изделие.	ISO 15223-1, клауза 5.1.6
	Производител	Посочва производителя на медицинското изделие, както е дефиниран в Директивите на ЕС 90/385/ЕИО, 93/42/ЕИО и 98/79/ЕО.	ISO 15223-1, клауза 5.1.1
	Дата на производство	Посочва датата, на която медицинското изделие е произведено.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Оторизиран представител в Европейската общност	Обозначава оторизирания представител в Европейската общност.	ISO 15223-1, клауза 5.1.2
	Съдържа достатъчно за <n> теста	Показва общия брой на IVD тестове, които могат да бъдат изпълнени с IVD. (Обикновено включени в комплекти реактиви).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Медицинско изделие за <i>in vitro</i> диагностика	Посочва медицинско изделие, което е предназначено за употреба като медицинско изделие за <i>in vitro</i> диагностика.	ISO 15223-1, клауза 5.5.1
	Температурно ограничение	Посочва температурните ограничения, до които медицинското изделие може да бъде излагано безопасно.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Вижте инструкциите за употреба	Посочва необходимостта потребителят да се консултира с инструкциите за употреба.	ISO 15223-1; 5.4.3
	СЕ маркировка	Европейска регулаторна маркировка за съответствие	Не е приложимо
	Съдържание	Не е приложимо	Не е приложимо
	Съдържание (опаковка)	Антимикробно средство (съкращение)	Не е приложимо

Легенда на символите			
Символ	Название на символа	Описание на стандарта	Стандарт
	Съдържание (опаковка)	Идентификация на хранителната среда (съкращение)	Не е приложимо
	Информационен лист за безопасност	Показва информационни листи за безопасност.	Не е приложимо
	Произведено в САЩ	Не е приложимо	Не е приложимо
	Само за експорт	Не е приложимо	Не е приложимо
	Обем на възстановяване	Не е приложимо	Не е приложимо
	Чупливо, манипулирайте внимателно	Указва медицинско изделие, което може да бъде счупено или повредено, ако с него се работи небрежно.	ISO 15223-1; 5.3.1
	От тук нагоре	Посочва правилното положение за изправяне	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: Медицински изделия – Символи, използвани в етикетите на медицинските изделия, при етикетиране и в предоставяната информация. Част 1: Общи изисквания).			

Beckman Coulter, стилизираното лого и маркировките за продуктите и услугите на Beckman Coulter, присъстващи в този документ, са търговски марки или регистрирани търговски марки на Beckman Coulter, Inc. в САЩ и в други страни.

MicroScan

Manual procedural de identificare rapidă a levurilor

REF B1017-70

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Panelul de identificare rapidă a levurilor este destinat identificării rapide a levurilor și a speciilor asemănătoarelor levurilor izolate din eșantioane clinice.

REZUMAT ȘI PRINCIPIU

Se utilizează teste convenționale cromogene și modificate pentru identificarea speciilor de levuri izolate din eșantioane clinice. Panelul de identificare rapidă a levurilor este un panel de microdiluție cu 96 de godeuri care utilizează 27 de substraturi deshidratate (a se vedea Tabelul 1-1). O suspensie grea a levurilor în apă autoclavată este utilizată pentru rehidratarea substraturilor. O identificare se obține după incubarea panelului la 35°C–37°C timp de 4 ore.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. Panelurile de identificare rapidă a levurilor sunt numai pentru diagnosticare *in vitro*.
2. Nu permiteți ca reactivul Peptidază sau Hidroxid de sodiu sau oricare dintre substraturile de identificare să intre în contact cu ochii, pielea sau îmbrăcămintea.
3. Respectați tehnicile aseptice și măsurile de precauție stabilite împotriva pericolelor microbiologice pe parcursul tuturor procedurilor, acordând atenție faptului că panelurile inoculate conțin organisme potențial patogene.
4. Toate materialele trebuie autoclavate înainte de eliminare.

DEPOZITARE

Păstrați panelurile și reactivul Peptidază la 2°C–8°C.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la adresa techdocs.beckmancoulter.com

COLECTAREA ȘI PREPARAREA SPECIMENELOR

Consultați Manual of Clinical Microbiology (Manual de microbiologie clinică)¹ al Societății Americane de Microbiologie sau alte manuale de micologie de referință pentru proceduri recomandate pentru transportul și izolarea levurilor. Testele cromogenice rapide se bazează pe prezența enzimelor preformate în organismul necunoscut.^{2,3,4} Astfel, mediul de acoperire pe care este crescut organismul va influența rezultatele testului din cauza inducerii unor enzime diferite prin medii diferite. Panelul de identificare rapidă a levurilor se bazează pe utilizarea agarului Sabouraud Dextroză (fie standard, fie modificarea Emmons). Prezența antibioticelor în mediul de creștere nu este o variabilă critică; cu toate acestea, nu trebuie să se utilizeze medii care conțin sânge, agar de extract de drojdie–extract de malț (YM) și agar de mucegai inhibitor (IMA).

MATERIALE FURNIZATE

Paneluri de identificare rapidă a levurilor (B1017-70)

Fișă de lucru

Manual procedural

Diagramă de control al calității

MATERIALE NECESARE, DAR NEINCLUSE

Apă pentru inocul (B1015-2)

Hidroxid de sodiu 0,05N (B1015-3)

Reactiv Peptidază (B1012-30B)

Standard de turbiditate pentru levuri (B1015-18)

Tăvi de acoperire (B1010-56B)

Lista de coduri de biotipuri de levuri MicroScan (B1014-1A)

Anse de inoculare

Plăci de agar Sabouraud dextroză

Agitator pentru omogenizare

Pipetor de 50 µl cu vârfuri

Incubator (35°C–37°C), fără CO₂

Organisme de control al calității:

C29879–AB

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDURA

Prepararea panelurilor

1. Scoateți din depozit panelurile care trebuie utilizate. **Panelurile nu trebuie utilizate dacă desicantul nu este prezent sau este rupt ori integritatea ambalajului este compromisă (neetanșat, perforat sau rupt).**
2. Tăiați punga și scoateți panelul. Scoateți imediat panelul din punga de folie. Permiteți panelurilor să ajungă la temperatura camerei înainte de rehidratare. Panourile pot fi stivuite cu o tavă de acoperire curată în partea de sus.

Prepararea inoculului

1. Inoculați panelul de identificare rapidă a levurilor cu un organism cu creștere activă. Coloniile dintr-o placă de agar Sabouraud dextroză de izolare primară pot fi utilizate dacă există o creștere suficientă. Dacă este necesar, subcultivați izolatul de levură pe o placă de agar Sabouraud dextroză și incubați-o până se produce o creștere suficientă. Se recomandă incubarea timp de 48 de ore la 30°C sau 48–72 de ore la 25°C (temperatura camerei).

OBSERVAȚIE: culturile incubate timp de mai mult de 48 de ore la 30°C trebuie utilizate doar dacă este necesară o incubare suplimentară pentru a obține o creștere adecvată.

2. Folosind un tampon steril sau o ansă de inoculare, îndepărtați creșterea de pe placa de agar și emulsificați în 3 ml de apă de inocul (apă deionizată autoclavată într-un tub de 13 x 84 mm sau 13 x 100 mm). Fiecare suspensie trebuie comparată cu Standardul de turbiditate pentru levuri MicroScan. Compararea cu suspensia cu inocul de test și Standardul de turbiditate pentru levuri trebuie făcută utilizându-se o sursă de lumină adecvată și prin compararea eprubetelor cu o cartelă albă cu linii negre contrastante.

OBSERVAȚIE: asigurați-vă că mediul agar nu este îndepărtat împreună cu organismul.

3. Amestecați sau turbionați suspensia până când este omogenă. Unele tulpini de levuri nu se dispersează ușor în apă. Dacă turbionarea nu are ca rezultat o suspensie omogenă, lăsați suspensia să stea timp de 10–15 minute și turbionați din nou. Dacă suspensia are în continuare aglomerări, lăsați aglomerările să se așeze pe fundul eprubetei și utilizați supernatant pentru a inocula panelul de levuri. Turbiditatea supernatantului trebuie să corespundă cu Standardul de turbiditate pentru levuri MicroScan. Dacă nu corespunde, transferați mai multă creștere spre apa pentru inocul și repetați procedura de mai sus.

OBSERVAȚIE: NU pipetați aglomerări de celule în panelul de levuri.

Inocularea panelurilor

1. Etichetați panelul cu numărul eșantionului.
2. Adăugați 50 μl de suspensie de levură la fiecare godeu care conține substrat și la godeurile BNAC și NPC. Nu se recomandă utilizarea unei pipete Pasteur pentru inoculare.

Tabelul 1-1, Substraturi

Substraturi	Abrev.	Substraturi	Abrev.
Hidroxi-prolină-β-naftilamidă	HPR	L-histidină-β-naftilamidă	HIS
L-izoleucină-β-naftilamidă	ILE	Sucroză	SUC1
L-prolină-β-naftilamidă	PRO	Sucroză	SUC2 ¹
L-tirozină-β-naftilamidă	TYR	Trehaloză	TRE
Glicină-β-naftilamidă	GLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranozidă	AGL1
Glicilglicină-β-naftilamidă	GGLY	p-nitrofenil-α-D-glucopiranozidă	AGL2 ¹
Glicil-L-arginină-4-metoxi-β-naftilamidă	GLAR	p-nitrofenil-β-D-glucopiranozidă	BGL
Glicil-L-prolină-4-metoxi-β-naftilamidă	GLPR	o-nitrofenil-β-D-galactopiranozidă	BGAL
L-arginil-L-arginină-β-naftilamidă	AARG	p-nitrofenil-β-D-fucopiranozidă	BDF
L-lisil-L-alanină-4-metoxi-β-naftilamidă	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galactopiranozidă	AGAL
L-alanină-4-metoxi-β-naftilamidă	ALA	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamină	NAG
L-seril-L-tirozină-β-naftilamidă	STY	p-nitrofenil-β-D-celobioză	CELL
Uree	URE	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galactosaminidă	NGAL
3-indoxil fosfat	IDX		

1. Sunt utilizate diferite formulări ale aceluiași substraturi.

3. După ce panelul a fost inoculat cu 50 μl de inocul, loviți ușor fiecare parte a panelului pentru a asigura amestecarea cu substratul.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

OBSERVAȚIE: dacă panelul trebuie citit pe un sistem WalkAway sau autoSCAN-4, trebuie inoculat și godeul LOC.

Incubarea

1. Stivuieți panelurile în grupuri de la 3 până la 5 cu o tavă de acoperire peste panelul din partea de sus pentru a preveni evaporarea.
2. Incubați panelurile inoculate timp de 4 ore la 35°C–37°C într-un incubator fără CO₂.

Citirea panelurilor

1. Scoateți reactivul Peptidază din frigider cu cel puțin 30 de minute înainte de a citi panelurile. Reactivul Peptidază poate precipita la 4°C, dar se va redizolva la temperatura camerei. Nu expuneți reactivul Peptidază la temperaturi ridicate pentru a accelera redizolvarea precipitatului cristalin, deoarece temperaturile ridicate vor determina degradarea reactivului.
2. Citiți panelurile utilizând lumina reflectată de un fundal alb.
3. După 4 ore de incubare, adăugați reactivii Peptidază și Hidroxid de sodiu (NaOH) în godeurile corespunzătoare.

- A. Adăugați **1 picătură** de reactiv Peptidază la godeurile BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY și HIS. Lăsați culoarea să se dezvolte timp de 30 de secunde înainte de înregistrarea rezultatelor. Rezultatele trebuie înregistrate în interval de 3 minute de la adăugarea reactivului. Prezența ORICĂREI nuanțe de roz sau de roșu în soluție în întregul godeu sau în oricare porțiune a godeului se interpretează ca pozitiv. Culoarele trebuie comparate cu godeul BNAC. Unele godeuri pot apărea ca fiind de nuanță portocalie mai închisă decât godeul BNAC. Acestea trebuie înregistrate ca negative. Reacțiile sunt pozitive numai dacă în soluție există nuanțe de roz sau roșu. Culoarea din aceste godeuri se va închide cu timpul. O culoare galbenă negativă poate deveni o culoare portocalie mai închisă. Aceasta trebuie interpretată ca reacție negativă.

OBSERVAȚIE: după adăugarea de reactiv Peptidază la godeul BNAC, acesta ar trebui să fie galben. Dacă există orice nuanță de roz sau roșu, reactivul Peptidază nu trebuie utilizat.

- B. Adăugați **1 picătură** de NaOH 0,05N la godeurile AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL și NGAL. Așteptați cel puțin 5 secunde, dar nu mai mult de 5 minute înainte de înregistrarea rezultatelor. Orice nuanță de galben trebuie înregistrată ca rezultat pozitiv. Comparați godeurile care conțin substrat cu godeul NPC.

OBSERVAȚIE: aceste godeuri pot părea de culoare mai închisă decât godeul NPC. Acest lucru trebuie interpretat ca rezultat negativ, însă trebuie să existe o culoare galbenă pentru a fi considerat rezultat pozitiv.

4. Sunt furnizate două godeuri de control pentru asistarea interpretării reacțiilor.
 - A. BNAC = control β-naftilamidă. După adăugarea reactivului Peptidază, acest godeu va avea culoarea galbenă.
 - B. NPC = control nitrofenil. Acest godeu trebuie să fie incolor.

5. Consultați secțiunea REZULTATE pentru ajutor în interpretarea biochimică.

OBSERVAȚIE: WalkAway citește godeuri care nu necesită mai întâi reactivi pentru a preveni rezultate alterate din cauza emanațiilor de reactiv care pot fi prinse sub capacul tăvii, deci reacțiile biochimice nu pot fi verificate manual.

REZULTATE

Interpretarea substraturilor

Godeu	Reactiv	Pozitivă	Negativ
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Adăugați 1 picătură de reactiv Peptidază. Permiteți dezvoltarea reacției de culoare timp de cel puțin 30 de secunde, dar nu mai mult de 3 minute.	Orice nuanță de roz și de la roșu la violet în soluție ¹	Galben spre portocaliu
SUC1 SUC2 TRE		Orice nuanță de brun sau galben	Violet
AGL1 BGL BGAL	Comparați cu godeul de control NPC.	Orice nuanță de galben ²	Limpede
URE		De la roz la violet	De la limpede/bej la galben
IDX		Orice nuanță de albastru	Limpede

Godeu	Reactiv	Pozitivă	Negativ
AGL2	Adăugați 1 picătură de NaOH 0,05 N. Așteptați cel puțin	Orice nuanță de	Limpede
BDF	5 secunde, dar nu mai mult de 5 minute înainte de	galben ²	
AGAL	înregistrarea rezultatului. Comparați cu godeul de control		
NAG	NPC.		
CELL			
NGAL			

1. Este posibil ca o culoare pozitivă să nu fie prezentă în întregul godeu.

2. O culoare roz poate fi prezentă cu unele levuri. Aceasta trebuie considerată o reacție pozitivă.

PRINCIPIILE REACȚIILOR DE IDENTIFICARE

Substraturi de β-naftilamidă aminoacidică (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Când substratul este hidrolizat de enzima corespunzătoare (de obicei, o arilamidază aminoacidică), se eliberează β-naftilamină. β-naftilamina se detectează prin adăugarea de p-dimetilaminocinamaldehydă (în reactivul Peptidază), care creează un complex de culoare de la roz la violet.

OBSERVAȚIE: enzima care scindează o β-naftilamidă aminoacidică este o arilamidază a aminoacidului. Termenul „aminopeptidază” este utilizat frecvent ca sinonim pentru arilamidază, însă reprezintă, de fapt, o enzimă cu specificitate diferită (o aminopeptidază scindează aminoacidul N-terminal dintr-o peptidă). O arilamidază și o aminopeptidază pot hidroliza același substrat de β-naftilamidă aminoacidică. Astfel, panelul nu măsoară neapărat enzime diferite și unice. O singură arilamidază poate hidroliza mai multe β-naftilamide aminoacidice.

Carbohidrați (SUC1, SUC2, TRE) – Utilizarea de sucroză și trehaloză are ca rezultat o scădere a pH-ului, care determină schimbarea roșului de clorofenol de la violet la galben. Aceste reacții de carbohidrați sunt selective și este posibil să nu se conformeze reacțiilor convenționale.

Substraturi de nitrofenil (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Dacă enzima corespunzătoare este prezentă, substratul este scindat, eliberând orto- sau para-nitrofenol. La pH alcalin, compușii sunt galbeni. Dacă reacția se produce la un pH acid, trebuie adăugat NaOH după incubare înainte ca rezultatele să poată fi citite. Godeurile pot fi fie incolore sau de culoare galben pal înainte de adăugarea hidroxidului de sodiu.

Indoxil fosfatază (IDX) – Indoxil fosfatul este scindat de o fosfatază pentru eliberarea indoxilului. Indoxilul se combină cu oxigenul pentru a forma albastru indigo, care este un precipitat insolubil albastru sau albastru-gri.

Uree (URE) – Ureea este scindată de urează pentru a forma amoniac și dioxid de carbon. Amoniacul (sub formă de carbonat de amoniu) determină o creștere a pH-ului, care este detectată prin schimbarea roșului de fenol de la galben la roșu.

IDENTIFICAREA ORGANISMELOR

Lista rapidă de coduri de biotipuri de levuri MicroScan se utilizează pentru identificarea organismelor de test necunoscute. Această listă de coduri a fost generată din baza de date MicroScan pentru testele incluse pe panelul de identificare. Lista de coduri pentru levuri se bazează pe o analiză computerizată a celor 27 de teste din panelul de identificare rapidă a levurilor. Rezultatele testelor sunt transformate într-un număr de biotip din 9 cifre pentru care lista de coduri conține o identificare a speciei și o probabilitate relativă cumulativă a identificării. Toate identificările posibile sunt imprimare în ordinea descrescătoare a celei mai mari probabilități a unui total cumulativ de 99,9%.

Dacă apare un număr de biotip care nu poate fi găsit în lista de coduri, trebuie suspectată mai întâi o eroare procedurală; de exemplu, numărul de biotip a fost adăugat incorect sau o reacție a fost înregistrată eronat. Dacă numărul de biotip este corect, trebuie verificată posibilitatea unei culturi amestecate și organismul trebuie retestat, cu accent special pe utilizarea unei suspensii de celule suficient de turbide. Dacă retestarea produce aceleași rezultate, consultați Serviciul de căutare a biotipurilor din site-ul Beckman Coulter sau consultați distribuitorul local.

LIMITARE A PROCEDURII

1. Panelurile de identificare rapidă a levurilor sunt destinate identificării levurilor și a organismelor asemănătoarelor levurilor (de exemplu, *Prototheca*). Trebuie acordată atenție organismelor cu producție excesivă de hifal.
2. Dacă se listează mai multe identificări de specii pentru un anumit număr de biotip, pot fi necesare teste suplimentare. Procedurile de identificare acceptate a levurilor și a organismelor asemănătoare levurilor includ morfologia colonială, creșterea la temperatură ridicată, formarea pigmentului și colorarea pe agar de fenoloxidază. Morfologia microscopică pe medii concepute pentru determinarea morfologiei tipice poate ajuta, de asemenea, la identificarea acestor organisme. Consultați procedurile de referință micologice corespunzătoare.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Pot apărea variații ale rezultatelor cromogenice din cauza suprainoculării sau subinoculării excesive a sistemului. Fiecare inocul trebuie comparat cu standardul de turbiditate pentru a se realiza concentrația corectă de inocul pentru performanțe optime.

CONTROLUL CALITĂȚII

Acceptabilitatea substraturilor de identificare trebuie verificată prin testarea unor organisme cu reacții cunoscute. Rezultatele pentru fiecare reacție pentru organisme de control MicroScan recomandate se găsesc în Diagrama de control al calității din acest manual.

Diagrama de control al calității – Substraturi de identificare rapidă a levurilor

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Specificațiile QC umbrite din tabelul de mai sus vor fi implementate în versiunile software-ului LabPro ≥ 1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Un rezultat pozitiv poate fi obținut cu *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.
3. Un rezultat negativ poate fi obținut cu *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Citirile instrumentului pot necesita verificări vizuale.
5. Un rezultat pozitiv poate fi obținut cu *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Observație: organismele pentru controlul calității sunt selectate pentru furnizarea de reacții pozitive/negative pentru toate substraturile de identificare. Ca urmare, identificarea organismului poate diferi de cea indicată în diagrama QC. Acceptabilitatea performanțelor produsului trebuie determinată prin compararea rezultatelor testelor, nu a identificării.

DECLARAȚIE PRIVIND GARANȚIA

Sistemul este acoperit de și se supune prevederilor garanției incluse în acordul dumneavoastră contractual privind sistemul sau reactivii acestuia. Clientul este responsabil pentru procedurile de întreținere preventive de rutină. Reparațiile rezultate în urma neefectuării acestor proceduri de întreținere la intervalele de timp indicate vor fi efectuate la discreția Beckman Coulter și pe cheltuiala clientului.

Cheie simboluri

Cheie simboluri			
Simbol	Titlu simbol	Descrierea standardului	Standard
	Nu reutilizați	Indică un dispozitiv medical care este destinat pentru o singură utilizare sau pentru utilizare pe un singur pacient în timpul unei singure proceduri.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Data expirării	Indică data după care dispozitivul medical nu mai trebuie utilizat.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Cod de lot	Indică codul de lot al producătorului pentru identificarea lotului sau seriei.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Număr catalog	Indică numărul de catalog al producătorului pentru identificarea dispozitivului medical.	ISO 15223-1, clauza 5.1.6
	Producător	Indică producătorul dispozitivului medical așa cum este definit în Directivele UE 90/385/CEE, 93/42/CEE și 98/79/CE.	ISO 15223-1, clauza 5.1.1

Cheie simboluri			
Simbol	Titlu simbol	Descrierea standardului	Standard
	Data fabricației	Indică data fabricării dispozitivului medical.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană	Indică reprezentantul autorizat în Comunitatea Europeană.	ISO 15223-1, clauza 5.1.2
	Conține o cantitate suficientă pentru <n> teste	Indică numărul total de teste IVD care pot fi efectuate cu IVD-ul. (Mențiunea apare, de obicei, pe seturile de reactivi).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Dispozitiv medical pentru diagnosticare <i>in vitro</i>	Indică un dispozitiv medical destinat utilizării ca dispozitiv medical de diagnosticare <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, clauza 5.5.1
	Limitare de temperatură	Indică limitele de temperatură la care dispozitivul poate fi expus în siguranță.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Consultați Instrucțiunile de utilizare	Indică necesitatea consultării instrucțiunilor de utilizare de către utilizator.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Marcaj CE	Marcaj de reglementare Conformitate europeană	N/A
	Cuprins	N/A	N/A
	Conținut (ambalaj)	Agent antimicrobian (abreviere)	N/A
	Conținut (ambalaj)	Substrat de identificare (abreviere)	N/A
	Fișă tehnică de securitate	Indică o fișă tehnică de securitate.	N/A
	Fabricat în SUA	N/A	N/A
	Numai pentru utilizare de export	N/A	N/A
	Volum de reconstituire	N/A	N/A
	Fragil, manipulați cu grijă	Indică un dispozitiv medical care se poate sparge sau poate fi deteriorat dacă nu este manipulat cu atenție.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Cu această parte în sus	Indică poziția verticală corectă	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: Dispozitive medicale – Simboluri pentru utilizare cu etichete de dispozitive medicale, etichetare și informații care trebuie furnizate. Partea 1: Cerințe generale).			

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

MicroScan

Priručnik za proceduru brze identifikacije kvasca

REF B1017-70

NAMENA

Panel za brzu identifikaciju kvasca je dizajniran za brzu identifikaciju kvasca i vrsta sličnih kvascu koje su izolovane iz kliničkih uzoraka.

KRATAK PREGLED I PRINCIP

Hromogeni i izmenjeni konvencionalni testovi se koriste za identifikaciju vrsta sličnih kvascu koje su izolovane iz kliničkih uzoraka. Panel za brzu identifikaciju kvasca je panel za mikrodiluciju sa 96 bunarčića koji koristi 27 dehidriranih supstrata (Pogledajte Tabelu 1-1). Velika suspenzija kvasa u vodi koja je sterilisana u autoklavu se koristi za rehidraciju supstrata. Identifikacija se dobija nakon inkubacije panela na temperaturi od 35–37°C u trajanju od 4 sata.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

1. Paneli za brzu identifikaciju kvasca su predviđeni samo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
2. Ne dozvolite da reagens peptidaze ili natrijum-hidroksida ili bilo koji supstrat za identifikaciju dođe u kontakt s očima, kožom ili odećom.
3. Pridržavajte se aseptičnih tehnika i utvrđenih mera predostrožnosti protiv mikrobioloških opasnosti tokom svih procedura i imajte na umu da inokulisani paneli sadrže potencijalno patogene organizme.
4. Svi materijali treba da budu sterilisani u autoklavu pre odlaganja u otpad.

ČUVANJE

Skladištite panele i reagens peptidaze na temperaturi od 2–8°C.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Nije klasifikovano kao opasno

SDS

Bezbednosni list je dostupan na internet adresi techdocs.beckmancoulter.com

PRIKUPLJANJE I PRIPREMA UZORAKA

Preporučene procedure za prenos i izolaciju kvasaca potražite u dokumentu „American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology“ (Mikrobiološki priručnik američkog društva za mikrobiologiju) ili u drugim referentnim mikološkim priručnicima. Brzi hromogeni testovi su zasnovani na prisustvu preformiranih enzima u nepoznatim organizmima.^{2,3,4} Tako će podloge na kojima je organizam uzgajan uticati na rezultate testa zbog indukcije različitih enzima od strane različitih podloga. Panel za brzu identifikaciju kvasca je zasnovan na upotrebi Saburovog dekstroznog agara (standardnog oblika ili Emonsove modifikacije). Prisustvo antibiotika u podlozi za rast nije kritična varijabla, ali medijumi koji sadrže krv, Yeast Extract-Malt Extract (YM) Agar i Inhibitory Mold Agar (IMA) ne treba da se koriste.

ISPORUČENI MATERIJALI

Paneli za brzu identifikaciju kvasca (B1017-70)

Radni list

Proceduralno uputstvo

Dijagram za kontrolu kvaliteta

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU OBEZBEĐENI

Voda za inokulum (B1015-2)

0.05N Natrijum-hidroksid (B1015-3)

Reagens za peptidazu (B1012-30B)

Standard zamućenosti kvasca (B1015-18)

Posude za pokrivanje (B1010-56B)

MicroScan Yeast Biotype Codebook (MicroScan šifarnik biotipova kvasca) (B1014-1A)

Eze

Ploče sa Saburovim dekstroznim agarom

Vrtložna mešalica

Pipetor od 50 µl sa vrhovima

Inkubator (35–37°C), ne-CO₂

Organizmi za kontrolu kvaliteta:

C29879-AB

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

POSTUPAK

Priprema panela

1. Izvadite panele koji će biti korišćeni iz skladišta. **Paneli se ne smeju koristiti ako desikant nije prisutan ili ako je slomljen ili ako je celovitost pakovanja ugrožena (otpečaćena, probušena ili pocepana).**
2. Isecite kesicu i izvadite panel. Odmah izvadite panel iz kesice od folije. Sačekajte da se paneli uravnoteže na sobnoj temperaturi pre obavljanja rehidracije. Paneli mogu biti složeni sa čistim poklopcem posude na vrhu.

Priprema inokuluma

1. Inokulišite panel za brzu identifikaciju kvasca s organizmom koji aktivno raste. Kolonije sa primarne izolacione ploče sa Saburovim dekstroznim agarom mogu da se koriste ako ima dovoljnog rasta. Ako je potrebno, potkulture kvasca se izoluju na ploči sa Saburovim dekstroznim agarom i inkubiraju se dok ne dođe do dovoljnog rasta. Preporučuje se inkubacija u trajanju od 48 sati na temperaturi od 30°C ili 48 do 72 sati na temperaturi od 25°C (sobna temperatura).

NAPOMENA: Kulture koje se inkubiraju duže od 48 sati na temperaturi od 30°C treba da se koriste samo ako je potrebna dodatna inkubacija potrebna da bi se dobio odgovarajući rast.

2. Sterilnim štapićem za uzimanje brisa ili ezom uklonite rast sa ploče sa agarom i emulgujte u 3 ml vode za inokulum (dejonizovana voda sterilisana u autoklavu u epruveti za uzorak od 13 x 84 mm ili 13 x 100 mm). Svaka suspenzija mora da se uporedi i da bude jednaka MicroScan standardu zamućenosti kvasca. Upoređivanje suspenzije inokuluma testa i standarda zamućenosti kvasca treba da se obavi korišćenjem odgovarajućeg izvora svetlost i upoređivanjem epruveta za uzorak sa belom karticom na kojoj se nalaze kontrastne crne linije.

NAPOMENA: Osigurajte da agar ne bude uklonjen iz organizma.

3. Promešajte ili promešajte u vorteksu suspenziju dok ne postane homogena. Neki sojevi kvasca se ne rastvaraju brzo u vodi. Ako mešanje u vorteksu ne dovede do homogene suspenzije, ostavite suspenziju da miruje 10–15 minuta i ponovo promešajte u vorteksu. Ako u suspenziji i dalje ima skupova ćelije, sačekajte da se skupovi skupne na dnu epruvete za uzorak i koristite supernatant za inokulaciju panela kvasca. Zamućenost supernatanta mora da odgovara MicroScan standardu zamućenosti kvasca. Ako ne odgovara, prenesite više rasta u vodu za inokulum i ponovite gorenavedenu proceduru.

NAPOMENA: NE pipetirajte skupove ćelija na panel kvasca.

Inokulacija panela

1. Označite panele brojem uzoraka.
2. Dodajte 50 µl suspenzije svakom bunarčiću koji sadrži supstrat i kontrolnim bunarčićima BNAC i NPC. Korišćenje Pasterove pipete za inokulaciju se ne preporučuje.

Tabela 1-1, Supstrati

Supstrati	Skr.	Supstrati	Skr.
Hidroksiprolin-β-Naftilamid	HPR	L-Histidin-β-Naftilamid	HIS
L-Izoleucin-β-Naftilamid	ILE	Saharoza	SUC1
L-Prolin-β-Naftilamid	PRO	Saharoza	SUC2 ¹
L-Tirozin-β-Naftilamid	TYR	Trehaloza	TRE
Glicin β-Naftilamid	GLY	p-Nitrofenil-α-D-Glukopiranozid	AGL1
Glicilglicin-β-Naftilamid	GGLY	p-Nitrofenil-α-D-Glukopiranozid	AGL2 ¹
Glicil-L-Arginin-4-Metoksi-β-Naftilamid	GLAR	p-Nitrofenil-β-D-Glukopiranozid	BGL
Glicil-L-Prolin-4-Metoksi-β-Naftilamid	GLPR	o-Nitrofenil-β-D-galaktopiranozid	BGAL
L-Arginin-L-Arginin-β-Naftilamid	AARG	p-Nitrofenil-β-D-Fukopiranozid	BDF
L-Lizil-L-Alanin-4-Metoksi-β-Naftilamid	LYAL	p-Nitrofenil-α-D-Galaktopiranozid	AGAL
L-Alanin-4-Metoksi-β-Naftilamid	ALA	p-Nitrofenil-N-Acetil-β-D-Glukozaamin	NAG
L-Seril-L-Tirozin-β-Naftilamid	STY	p-Nitrofenil-β-D-Celobioza	CELL
Urea	URE	p-Nitrofenil-N-Acetil-β-D-Galaktosaminid	NGAL
3-Indoksil fosfat	IDX		

1. Koriste se različite formulacije istih supstrata.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

3. Nakon inokulacije panela primenom 50 µl inokuluma, blago dodirnite svaku stranu panela da biste osigurali mešanje sa supstratom.

NAPOMENA: Ako se panel očitava na sistemu WalkAway ili autoSCAN-4, i LOC bunarčić mora da bude inokulisan.

Inkubacija

1. Složite panele u grupe od 3 do 5 sa poklopcem posude postavljenim preko vrha panela da biste sprečili isparavanje.
2. Inkubirajte inokulisane panele 4 sata na 35–37°C u ne-CO₂ inkubatoru.

Čitanje panela

1. Izvadite reagens peptidaze iz frižidera najmanje 30 minuta pre očitavanja panela. Reagens peptidaze može da precipitira na temperaturi od 4°C, ali će se ponovo rastvoriti na sobnoj temperaturi. Nemojte izlagati reagens peptidaze povišenim temperaturama radi ubrzavanja ponovnog rastvaranja kristalnog precipitata zato što visoke temperature mogu da izazovu degradaciju reagensa.
2. Očitavajte panele na reflektovanoj svetlosti sa bele pozadine.
3. Nakon 4 sata inkubacije, dodajte reagentne peptidaze i natrijum-hidroksida (NaOH) u odgovarajuće bunarčiće.

- A. Dodajte **1 kap** reagentne peptidaze u bunarčiće BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY i HIS. Sačekajte da se boja razvija 30 sekundi pre beleženja rezultata. Rezultati mogu da se zabeleže do 3 minuta nakon dodavanja reagensa. Prisustvo SVAKE nijanse ružičaste ili crvene u rastvoru u celom bunarčiću ili bilo kom delu bunarčića se tumači kao pozitivan rezultat. Boje moraju da se uporede sa BNAC bunarčićem. Neki bunarčići mogu imati tamniju narandžastu boju u odnosu na bunarčić BNAC. Ti rezultati treba da se zabeleže kao negativni. Reakcije su pozitivne samo ako u rastvoru ima ružičaste ili crvene. Boja u ovim bunarčićima će potamneti vremenom. Negativna žuta boja može da postane tamnija narandžasta boja. Ova reakcija treba da se zabeleži kao negativna.

NAPOMENA: Nakon dodatka peptidaze BNAC bunarčiću, treba da postane žut. Ako ima ružičaste ili crvene, reagens peptidaze se ne sme koristiti.

- B. Dodajte **1 kap** 0,05N NaOH u bunarčiće AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL i NGAL. Sačekajte najmanje 5 sekundi – ali ne duže od 5 minuta – pre beleženja rezultata. Svaka nijansa žute treba da se zabeleži kao pozitivna. Uporedite bunarčiće koji sadrže supstrat sa NPC bunarčićem.

NAPOMENA: Ovi bunarčići izgledaju tamnije od NPC bunarčića. Ovaj rezultat se treba tumačiti kao negativan, a žuta boja mora da bude prisutna da bi se smatrao pozitivnim.

4. Dva kontrolna bunarčića se isporučuju kao pomoć u tumačenju reakcija.
 - A. BNAC = kontrola β-naftilamida. Ovaj bunarčić će imati žutu boju nakon dodavanja reagensa peptidaze.
 - B. NPC = kontrola nitrofenila. Ovaj bunarčić treba da bude bezbojan.
5. Pogledajte odeljak REZULTATI koji pomaže u biohemijskom tumačenju.

NAPOMENA: Sistem WalkAway očitava bunarčiće kod kojih nije potrebna prvobitna upotreba reagenasa zbog sprečavanja izmenjenih rezultata zbog para reagenasa koje mogu biti zarobljene ispod poklopca posude i zato se biohemijske reakcije ne mogu proveriti ručno.

REZULTATI

Tumačenja supstrata

Komora	Reagens	Pozitivno	Negativno
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Dodajte 1 kap reagensa peptidaze. Sačekajte najmanje 30 sekundi da se razvije reakcija s bojom, ali ne duže od 3 minuta.	Sve nijanse ružičaste, crvene do boje magente u rastvoru ¹	Žuta do narandžasta
SUC1 SUC2 TRE		Sve nijanse smeđe ili žute	Ljubičasta
AGL1 BGL BGAL	Uporedite sa kontrolnim bunarčićem NPC.	Sve nijanse žute ²	Bistra

Komora	Reagens	Pozitivno	Negativno
URE		Ružičasta do boje magenta	Bezbojna/bež do žute
IDX		Sve nijanse plave	Bistra
AGL2	Dodajte 1 kap 0,05 N NaOH. Sačekajte najmanje 5 sekundi – ali ne duže od 5 minuta – pre beleženja rezultata. Uporedite sa kontrolnim bunarčićem NPC.	Sve nijanse žute ²	Bistra
BDF			
AGAL			
NAG			
CELL			
NGAL			

1. Pozitivna boja možda neće biti prisutna u celom bunarčiću.

2. Kod nekih kvasaca može da bude prisutna ružičasta boja. To se treba smatrati pozitivnom reakcijom.

PRINCIPI REAKCIJA ZA IDENTIFIKACIJU

Supstrati aminokiseline β -naftilamida (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - Kada se izvrši hidroliza supstrata odgovarajućim enzimom (obično arilamidazom aminokiseline), oslobađa se β -naftilamin. β -naftilamin se detektuje dodavanjem p-dimetilaminocinamaldehida (u reagensu peptidaze) koji kreira kompleks koji je ružičaste do ljubičaste boje.

NAPOMENA: Enzim koji razdvaja aminokiselinu je β -naftilamida arilamidaza aminokiseline. Termin „aminopeptidaza“ se često koristi kao sinonim za arilamidazu ali se zapravo odnosi na enzim drugačijeg svojstva (aminopeptidaza razdvaja aminokiselinu N-terminusa iz peptida). Arilamidaza i aminopeptidaza mogu da izvrše hidrolizu istog supstrata aminokiseline β -naftilamida. Zato panel ne meri nužno različite i jedinstvene enzime. Jedna arilamidaza može da izvrši hidrolizu više aminokiselina β -naftilamida.

Ugljeni hidrati (SUC1, SUC2, TRE) – Korišćenje sukroze i trehaloze dovodi do pada pH vrednosti što dalje dovodi do promene crvene boje hlorofenola u ljubičastu do žute. Ove reakcije ugljenih hidrata su selektivne i možda neće biti u skladu sa konvencionalnim reakcijama.

Supstrati nitrofenila (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Ako je odgovarajući enzim prisutan, substrat se razdvaja i oslobađa orto- ili para-nitrofenol. Ova jedinjenja su žute boje pri alkalnoj pH vrednosti. Ako do reakcije dođe pri kiseloj pH vrednosti, NaOH se mora dodati nakon inkubacije da bi rezultati mogli da budu pročitani. Bunarčići mogu da budu bezbojni ili svetložute boje pre dodavanja natrijum-hidroksida.

Indoksil fosfataza (IDX) – Indoksil fosfat se razdvaja fosfatazom i oslobađa se indoksil. Indoksil se kombinuje sa kiseonikom i formira indigo plavu boja koja je nerastvorivi plavi ili plavo-sivi precipitat.

Urea (URE) – Urea se deli ureazom na amonijak i ugljen-dioksid. Amonijak (u obliku amonijum karbonata) dovodi do rasta pH vrednosti koji se detektuje promenom crvene boje fenola u žutu do crvene.

IDENTIFIKACIJA ORGANIZAMA

Dokument „MicroScan Rapid Yeast Biotype Codebook“ (MicroScan šifarnik biotipova kvasca) se koristi za identifikaciju nepoznatih testnih organizama. Šifarnik je kreiran iz MicroScan baze podataka za testove koje sadrži panel za identifikaciju. Šifarnik kvasca je zasnovan na računarskoj analizi 27 testova na panelu za brzu identifikaciju kvasca. Rezultati testova su konvertovani u 9-cifrene brojeve biotipova za koje šifarnik navodi identifikaciju vrste i kumulativnu relativnu verovatnoću identifikacije. Sve moguće identifikacije se štampaju u padajućem redosledu najveće verovatnoće do ukupnog kumulativnog procenta od 99,9%.

Ako dođe do broja biotipa koji ne može da se pronađe u šifarniku, prvo treba posumnjati na proceduralnu grešku. Na primer, broj biotipa je pogrešno unet ili je reakcija pogrešno zabeležena. Ako je broj biotipa tačan, treba proveriti mogućnost mešovite kulture i organizam treba ponovo testirati, sa posebnim naglaskom na korišćenju suspenzije ćelija odgovarajuće zamućenosti. Ako ponovnim testiranjem postignete iste rezultate, pogledajte opciju „Biotype Lookup Service“ (Usluga pretrage biotipa) na veb-lokaciji kompanije Beckman Coulter ili se obratite lokalnom distributeru.

OGRANIČENJA POSTUPKA

1. Paneli za brzu identifikaciju kvasca su dizajnirani za identifikaciju kvasca i organizama sličnih kvascu (npr. *Prototheca*). Mora se paziti na organizme sa prekomernom proizvodnjom hifa.
2. Ukoliko se za određeni broj biotipa navede više od jedne identifikacije vrste, mogu biti potrebni dodatni testovi. Prihvaćene procedure identifikacije kvasca i organizama sličnih kvascu obuhvataju kolonijalnu morfologiju, rast na povišenoj temperaturi, formiranje pigmenta i boje na agaru fenoloksidaze. Mikroskopska morfologija na medijumima koji su dizajnirani za izvlačenje tipične morfologije takođe mogu da pomognu kod identifikacije ovih organizama. Pridržavajte se odgovarajućih mikoloških referentnih procedura.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Do varijacija u hromogenskim rezultatima može doći zbog značajno prekomerne ili nedovoljne inokulacije sistema. Svaki inokulum mora da se uporedi sa standardom zamućenosti kako bi se postigla odgovarajuća koncentracija inokuluma za optimalni učinak.

KONTROLA KVALITETA

Prihvatljivost supstrata za identifikaciju treba proveriti testiranjem organizama sa poznatim reakcijama. Rezultati za svaku reakciju za preporučene MicroScan kontrolne organizme su navedeni u dijagramu kontrole kvaliteta u ovom uputstvu.

Dijagram kontrole kvaliteta za supstrate za brzo identifikovanje kvasca

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Zatamnjene specifikacije kontrole kvaliteta u tabeli iznad će biti implementirane u softver LabPro, u 1.90 i novijim verzijama.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Pozitivan rezultat može da se dobije sa *Rhodotulula rubra*, ATCC 66034.
3. Negativan rezultat može da se dobije sa *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Očitavanja na instrumentima mogu da zahtevaju vizuelnu proveru.
5. Pozitivan rezultat može da se dobije sa *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Napomena: Organizmi za kontrolu kvaliteta su izabrani tako da daju pozitivne/negativne reakcije za sve supstrate za identifikaciju. Kao rezultat toga, identifikacije organizama se mogu razlikovati od onih navedenih u dijagrama kontrole kvaliteta (QC). Prihvatljivost performansi proizvoda treba da se odredi upoređivanjem rezultata testiranja, a ne identifikacijom.

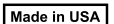
IZJAVA O GARANCIJI

Sistem je obuhvaćen i podleže odredbama garancije sadržanim u ugovornom sporazumu za sistem ili njegove reagensse. Kupac je odgovoran za rutinske postupke preventivnog održavanja. Popravke koje su posledica nepoštovanja ovih procedura održavanja u naznačenim vremenskim intervalima vrše se po odluci kompanije Beckman Coulter, a o trošku kupca.

Ključ za simbole

Ključ za simbole			
Simbol	Naziv simbola	Opis standarda	Standard
ⓧ	Ne upotrebljavati ponovo	Označava medicinsko sredstvo koje je namenjeno za jednokratnu upotrebu ili za upotrebu na jednom pacijentu tokom jedne procedure.	ISO 15223-1; 5.4.2
⌚	Upotrebiti do	Označava datum nakon kojeg medicinsko sredstvo ne treba koristiti.	ISO 15223-1; 5.1.4
LOT	Kód serije	Označava šifru serije proizvođača, tako da se mogu identifikovati serija ili lot.	ISO 15223-1; 5.1.5

Ključ za simbole

Simbol	Naziv simbola	Opis standarda	Standard
	Kataloški broj	Označava kataloški broj proizvođača tako da se medicinsko sredstvo može identifikovati.	ISO 15223-1, clause 5.1.6 (ISO 15223-1, klauzula 5.1.6)
	Proizvođač	Označava proizvođača medicinskog sredstva, kao što je definisano u EU Direktivama 90/385/EEC, 93/42/EEC i 98/79/EC.	ISO 15223-1, clause 5.1.1 (ISO 15223-1, klauzula 5.1.1)
	Datum proizvodnje	Označava datum kada je medicinsko sredstvo proizvedeno.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici	Označava ovlašćenog zastupnika u Evropskoj zajednici.	ISO 15223-1, clause 5.1.2 (ISO 15223-1, klauzula 5.1.2)
	Sadržaj dovoljan za <n> testova	Označava ukupan broj IVD testova koji se mogu obaviti pomoću IVD. (Tipično se nalazi na kompletima reagenasa).	ISO 15223-1; 5.5.5
	<i>In Vitro</i> dijagnostičko medicinsko sredstvo	Označava medicinski uređaj koji je namenjen za korišćenje kao <i>in vitro</i> dijagnostičko medicinsko sredstvo.	ISO 15223-1, clause 5.5.1 (ISO 15223-1, klauzula 5.5.1)
	Ograničenje temperature	Označava ograničenja temperature kojima se medicinsko sredstvo može bezbedno izložiti.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Pogledati Uputstvo za upotrebu	Označava potrebu da korisnik pogleda uputstvo za upotrebu.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE oznaka	Evropska regulatorna oznaka usklađenosti	Nije primenljivo
	Sadržaj	Nije primenljivo	Nije primenljivo
	Sadržaj (pakovanje)	Antimikrobno sredstvo (skraćenica)	Nije primenljivo
	Sadržaj (pakovanje)	Supstrat za identifikaciju (skraćenica)	Nije primenljivo
	Bezbednosni list	Označava bezbednosni list.	Nije primenljivo
	Proizvedeno u SAD	Nije primenljivo	Nije primenljivo
	Samo za izvoz	Nije primenljivo	Nije primenljivo
	Zapremina rekonstitucije	Nije primenljivo	Nije primenljivo
	Lomljivo, rukujte pažljivo	Označava medicinsko sredstvo koje se može slomiti ili oštetiti ako se sa njim ne rukuje pažljivo.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Ova strana gore	Označava ispravan uspravan položaj	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: Medicinska sredstva – Simboli koji se koriste za obeležavanje medicinskih sredstava, obeležavanje pakovanja i informacije koje treba da se dostave. Deo 1: Opšti zahtevi).			

Beckman Coulter, stilizovani logotip i Beckman Coulter robni i servisni žigovi koji se navode u ovom dokumentu su žigovi ili registrovani žigovi kompanije Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim zemljama.

MicroScan

Manual de procedimentos de identificação rápida de leveduras

REF B1017-70

USO PREVISTO

O Pannel de identificação rápida de leveduras foi desenvolvido para a identificação rápida de leveduras e espécies tipo levedura isoladas dos espécimes clínicos.

SUMÁRIO E PRINCÍPIO

Testes convencionais modificados e cromogênicos são utilizados para a identificação de espécies de leveduras isoladas dos espécimes clínicos. O Pannel de identificação rápida de leveduras é um pannel de microdiluição com 96 poços que utiliza 27 substratos desidratados (consulte a Tabela 1-1). Uma suspensão pesada da levedura em água esterilizada em autoclave é utilizada para reidratar os substratos. Uma identificação é obtida após a incubação do pannel a uma temperatura de 35–37°C por 4 horas.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Os Painéis de identificação rápida de leveduras se destinam apenas ao uso em diagnóstico *in vitro*.
2. Não permita que o reagente peptidase ou hidróxido de sódio, 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 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 o reagente peptidase a uma temperatura de 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

Consulte o Manual of Clinical Microbiology (Manual de microbiologia clínica) da American Society for Microbiology¹ ou qualquer outro manual de referência de micologia em busca dos procedimentos recomendados para o transporte e isolamento de leveduras. Os testes cromogênicos rápidos são baseados na presença de enzimas pré-formadas no organismo desconhecido.^{2,3,4} Dessa forma, o meio de plaqueamento no qual o organismo está sendo desenvolvido influenciará os resultados do teste, por conta da indução de diferentes enzimas por um meio diferente. O Pannel de identificação rápida de leveduras se baseia no uso de ágar Sabouraud Dextrose (padrão ou modificação de Emmons). A presença de antibióticos no meio de desenvolvimento não é uma variável crítica; contudo, o meio contendo sangue, o ágar de extração de levedura-extração de malte (YM) e o ágar inibidor de fundo (IMA) não devem ser utilizados.

MATERIAIS FORNECIDOS

Painéis de identificação rápida de leveduras (B1017-70)

Planilha de dados

Manual de procedimentos

Tabela de controle de qualidade

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Água de inóculo (B1015-2)

Hidróxido de sódio 0,05 N (B1015-3)

Reagente peptidase (B1012-30B)

Padrão de turbidez de levedura (B1015-18)

Bandejas de proteção (B1010-56B)

Código de biótipos de leveduras MicroScan (B1014-1A)

Laços de inoculação

Placas de ágar Sabouraud Dextrose

Misturador vórtex

Pipeta de 50 µL com pontas

Incubadora (35–37°C), sem CO₂

Organismos de controle de qualidade:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDIMENTO

Preparação de painéis

1. Retire os painéis a serem utilizados do local de armazenamento. **Os painéis não deverão ser usados se não houver desseccantes, 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. Inocule o Painel de identificação rápida de leveduras com um organismo em crescimento ativo. Colônias de uma placa ágar Sabouraud Dextrose de isolamento primário podem ser usadas caso haja desenvolvimento suficiente. Se necessário, realize a subcultura da levedura isolada em uma placa ágar Sabouraud Dextrose e incube até que ocorra desenvolvimento suficiente. Recomenda-se incubação por 48 horas a 30°C ou de 48 a 72 horas a 25°C (temperatura ambiente).

NOTA: culturas incubadas por mais de 48 horas a 30°C devem ser usadas apenas se for necessária incubação adicional para obter crescimento adequado.

2. Utilizando um swab estéril ou alça de inoculação, retire o desenvolvimento da placa ágar e emulsifique em 3 mL de água de inóculo (água deionizada esterilizada em autoclave em um tubo de 13 x 84 mm ou 13 x 100 mm). Cada suspensão deve ser comparada e deve ser equivalente ao padrão de turbidez de levedura MicroScan. A comparação com a suspensão de inóculo do teste e o padrão de turbidez de levedura deve ser feita usando uma fonte de luz adequada e comparando os tubos com um cartão branco contendo linhas pretas em contraste.

NOTA: tome cuidado para garantir que nenhum meio ágar seja removido com o organismo.

3. Misture ou agite em vórtex a suspensão até que fique homogênea. Algumas cepas de levedura não se dispersam rapidamente em água. Se agitar em vórtex não resultar em uma suspensão homogênea, deixe a suspensão descansar por 10–15 minutos e volte a agitar em vórtex. Se a suspensão ainda tiver massas aglomeradas, deixe as massas acumularem no fundo do tubo e use o sobrenadante para inocular o painel de levedura. A turbidez do sobrenadante deve estar de acordo com o padrão de turbidez de levedura MicroScan. Caso isso não aconteça, transfira mais do desenvolvimento para a água de inóculo e repita o procedimento acima.

NOTA: NÃO pipete massas aglomeradas de células no painel de levedura.

Inoculação do painel

1. Identifique o painel com o número do espécime.
2. Adicione 50 µL de suspensão de levedura a cada poço contendo substrato e nos poços de controle BNAC e NPC. O uso de uma pipeta de Pasteur para inoculação não é recomendado.

Tabela 1-1, Substratos

Substratos	Abr.	Substratos	Abr.
Hidroxiprolina-β-naftilamida	HPR	L-Histidina-β-naftilamida	HIS
L-Isoleucina-β-naftilamida	ILE	Sacarose	SUC1
L-prolina-β-naftilamida	PRO	Sacarose	SUC2 ¹
L-Tirosina-β-naftilamida	TYR	Trealose	TRE
Glicina β-naftilamida	GLY	p-Nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo	AGL1
Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY	p-Nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo	AGL2 ¹
Glicil-L-arginina-4-metoxi-β-naftilamida	GLAR	p-Nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo	BGL
Glicil-L-prolina-4-metoxi-β-naftilamida	GLPR	o-Nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	BGAL
L-Arginil-L-arginina-β-naftilamida	AARG	p-Nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo	BDF

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Substratos	Abr.	Substratos	Abr.
L-Lisil-L-alanina-4-metoxi-β-naftilamida	LYAL	p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo	AGAL
L-Alanina-4-metoxi-β-naftilamida	ALA	p-Nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina	NAG
L-Seril-L-tirosina-β-naftilamida	STY	p-Nitrofenil-β-D-celobiose	CELL
Ureia	URE	p-Nitrofenil-N-acetil-β-D-galactosaminida	NGAL
3-indoxil fosfato	IDX		

1. Formulações diferentes dos mesmos substratos são utilizadas.

- 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.

NOTA: se o painel precisar ser lido no WalkAway ou autoSCAN-4, o poço LOC também precisa ser inoculado.

Incubação

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

Leitura dos painéis

- Retire o reagente peptidase do refrigerador ao 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 a redissolução do precipitado cristalino, pois as altas temperaturas causarão a degradação do reagente.
- Leia os painéis usando luz refletida de um fundo branco.
- Após 4 horas de incubação, adicione os reagentes peptidase e hidróxido de sódio (NaOH) aos poços apropriados.

- Adicione **1 gota** de reagente peptidase aos poços BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS. Deixe a coloração se desenvolver por 30 segundos antes de registrar os resultados. Os resultados precisam ser registrados em até 3 minutos após a adição do reagente. A presença de QUALQUER tonalidade de rosa ou vermelho na solução, por todo o poço ou em qualquer parte dele, é interpretada como um resultado positivo. As cores devem ser comparadas com o poço BNAC. Alguns poços podem apresentar uma coloração laranja mais escura do que a do poço BNAC. Esses devem ser registrados como negativos. As reações são positivas apenas se houver coloração rosa ou vermelha na solução. A coloração nesses poços irá escurecer com o tempo. Uma coloração amarela negativa pode se tornar uma coloração laranja mais escura. Isso deve ser interpretado como uma reação negativa.

NOTA: após a adição de peptidase no poço BNAC, ele deve se tornar amarelo. Caso haja a presença de uma coloração rosa ou vermelha, o reagente peptidase não deve ser usado.

- Adicione **1 gota** de NaOH 0,05 N aos poços AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL e NGAL. Aguarde pelo menos 5 segundos, mas não mais do que 5 minutos, para registrar os resultados. Qualquer tonalidade de amarelo deve ser registrada como um resultado positivo. Compare os poços contendo substrato com o poço NPC.

NOTA: esses poços podem apresentar uma coloração mais escura do que a do poço NPC. Isso deve ser interpretado como um resultado negativo, mas uma coloração amarela deve estar presente para ser considerado 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 terá a coloração amarela.
 - NPC = controle nitrofenil. Esse poço deve ser incolor.

- Consulte a seção RESULTADOS para obter auxílio sobre a interpretação bioquímica.

NOTA: o WalkAway lê primeiro os poços que não exigem reagentes para evitar a alteração nos resultados por conta de vapores de reagentes que podem ficar presos sob a tampa da bandeja, o que impede a verificação manual das reações bioquímicas.

RESULTADOS

Interpretações de substrato

Poço	Reagente	Positivo	Negativo
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Adicione 1 gota de reagente peptidase. Deixe a reação de coloração se desenvolver por, no mínimo, 30 segundos, mas não mais do que 3 minutos.	Qualquer tonalidade de rosa e vermelho a magenta na solução ¹	Amarelo a laranja
SUC1 SUC2 TRE		Qualquer tonalidade de marrom ou amarelo	Roxo
AGL1 BGL BGAL	Compare com o poço de controle NPC.	Qualquer tonalidade de amarelo ²	Transparente
URE		Rosa para magenta	Incolor/bege para amarelo
IDX		Qualquer tonalidade de azul	Transparente
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Adicione 1 gota de NaOH 0,05 N. Aguarde pelo menos 5 segundos, mas não mais do que 5 minutos, para registrar o resultado. Compare com o poço de controle NPC.	Qualquer tonalidade de amarelo ²	Transparente

1. Uma coloração positiva pode não estar presente em todo o poço.

2. Uma coloração rosa pode estar presente com algumas leveduras. Isso deve ser considerado uma reação positiva.

PRINCÍPIOS DAS REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO

Substratos de aminoácido β-naftilamida (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) — Quando o substrato é hidrolisado pela enzima adequada (geralmente um aminoácido arilamidase), a β-naftilamina é liberada. A β-naftilamida é detectada pela adição de p-dimetilaminocinamaldeído (no reagente peptidase) que cria um complexo com coloração de rosa a roxa.

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 especificidade diferente (um aminopeptidase cliva o aminoácido N-terminal de um peptídeo). Um arilamidase e um aminopeptidase podem hidrolisar o mesmo substrato aminoácido β-naftilamida. Por essa razão, o painel não está necessariamente medindo enzimas diferentes e únicas. Um único arilamidase pode hidrolisar diversos aminoácidos β-naftilamidas.

Carboidratos (SUC1, SUC2, TRE) — A utilização de sacarose e trealose resulta em uma queda de pH que faz com que o clorofenol vermelho mude de roxo para amarelo. Essas reações de carboidratos são seletivas e podem não corresponder às reações convencionais.

Substratos de nitrofenil (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) — Se a enzima apropriada estiver presente, o substrato é clivado liberando orto- ou para-nitrofenol. Em pH alcalino, esses componentes são amarelos. Se a reação ocorrer em um pH ácido, NaOH deve ser adicionado após a incubação, antes de realizar a leitura dos resultados. Os poços podem ser incolores ou amarelos-claros antes da adição do hidróxido de sódio.

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

Ureia (URE) — Ureia é dividida por urease para formar amônia e dióxido de carbono. A amônia (na forma de carbonato de amônio) causa uma elevação no pH que é detectada pelo fenol vermelho mudando de amarelo para vermelho.

IDENTIFICAÇÃO DE ORGANISMOS

O Código de biótipos para identificação rápida de leveduras MicroScan é usado para a identificação de organismos de teste desconhecidos. Esse código foi gerado a partir do banco de dados MicroScan para os testes incluídos no painel de identificação. O Código de leveduras se baseia em uma análise de computador dos 27 testes do Painel de identificação

rápida de leveduras. Os resultados do teste são transformados em um número de biótipo de 9 dígitos, para o qual o Código lista a identificação da espécie e uma probabilidade relativa e cumulativa de identificação. Todas as identificações possíveis são impressas em ordem descendente de probabilidade, até um total cumulativo de 99,9%.

Caso ocorra um número de biótipo que não seja encontrado no código, é preciso primeiro suspeitar de um erro de procedimento; por exemplo, o número do biótipo foi adicionado incorretamente ou uma reação foi registrada de maneira equivocada. Se o número do biótipo estiver correto, a possibilidade de uma cultura misturada deve ser verificada e o organismo deve ser retestado, com ênfase especial no uso de uma suspensão de célula suficientemente turva. Se o novo teste gerar os mesmos resultados, consulte o Serviço de busca de biótipo no site da Beckman Coulter ou consulte o seu revendedor local.

LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

- Os Painéis de identificação rápida de leveduras foram criados para identificação de levedura e organismos tipo levedura (por exemplo, *Prototheca*). É preciso tomar cuidado com organismos que produzem hifa em excesso.
- No caso da identificação de mais de uma espécie listada para um número em particular de biótipo, testes suplementares podem ser necessários. Os procedimentos aceitos de identificação de levedura e organismos tipo levedura incluem morfologia colonial, crescimento a temperaturas elevadas, formação de pigmento e coloração em ágar de fenoloxidase. A morfologia microscópica em meio desenvolvido para obter morfologia típica também pode ajudar na identificação desses organismos. Consulte os procedimentos de referência de micologia apropriados.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
- A variação em resultados cromogênicos pode ocorrer por conta de sub ou superinoculação excessiva do sistema. Cada inóculo precisa ser comparado com o padrão de turbidez para alcançar a concentração correta de inóculo para desempenho ideal.

CONTROLE DE QUALIDADE

A aceitação dos substratos de identificação deve ser verificada testando os organismos de reações conhecidas. Os resultados de cada reação para os organismos de controle MicroScan recomendados são encontrados na Tabela de controle de qualidade localizada neste manual.

Tabela de controle de qualidade de substratos de identificação rápida de leveduras

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

As especificações do CQ sombreadas na tabela acima serão implantadas nas versões do software LabPro ≥1,90.

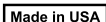
- American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
- Um resultado positivo pode ser obtido com *Rhodoturula rubra*, ATCC 66034.
- Um resultado negativo pode ser obtido com *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
- Leituras de instrumento podem requerer verificação visual.
- Um resultado positivo pode ser obtido com *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Nota: os organismos de controle de qualidade são selecionados para apresentar reações positivas/negativas para todos os substratos de identificação. Como resultado, a identificação de organismos pode variar do que está apresentado na tabela de CQ. A aceitabilidade de desempenho do produto deve ser determinada pela comparação dos resultados dos testes, não pela identificação.

DECLARAÇÃO DE GARANTIA

O sistema está coberto e sujeito às disposições da garantia incluída no seu acordo contratual para o sistema ou seus reagentes. O cliente é responsável pelos procedimentos de manutenção preventiva de rotina. Os reparos gerados pelo não cumprimento desses procedimentos de manutenção nos intervalos de tempo indicados são feitos a critério da Beckman Coulter e à custa do cliente.

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
	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

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Título do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	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

Procedurehandleiding snel gist ID

REF B1017-70

BEOOGD GEBRUIK

Het panel voor snelle gistidentificatie dient voor het snel identificeren van gist en gistachtige soorten die zijn geïsoleerd uit klinische specimina.

OVERZICHT EN PRINCIPE

Chromogene en aangepaste conventionele tests worden gebruikt voor het identificeren van gistsoorten die zijn geïsoleerd uit klinische specimina. Het panel voor snelle gistidentificatie is een microdilutiepanel met 96 wells dat gebruik maakt van 27 gedehydrateerde stoffen (zie tabel 1-1). Een zware suspensie van het gist in geautoclaveerd water wordt gebruikt om de stoffen opnieuw te hydrateren. Er wordt een identificatie verkregen nadat het panel gedurende 4 uur heeft geïncubeerd bij een temperatuur van 35-37 °C.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

1. Panels voor snelle gistidentificatie dienen uitsluitend voor *in-vitro* diagnostisch gebruik.
2. Pas op dat peptidase- of natriumhydroxide-reagens of een identificatiestof niet in contact komt met de ogen, huid of kleding.
3. Maak tijdens alle procedures gebruik van aseptische technieken en houd u aan de voorzorgsmaatregelen met betrekking tot microbiologisch gevaar. Houd er rekening mee dat geïnculeerde panels mogelijk pathogene organismen bevatten.
4. Al het materiaal dient in een autoclaaf te worden gereinigd voordat het als afval wordt verwijderd.

OPSLAG

Bewaar panels en peptidasereagens bij 2-8 °C.

GHS GEVARENCLASSIFICATIE

Niet geclassificeerd als gevaarlijk



Het veiligheidsinformatieblad is beschikbaar op techdocs.beckmancoulter.com

VERZAMELEN EN PREPAREREN VAN SPECIMEN

Raadpleeg de Manual of Clinical Microbiology¹ (Handleiding klinische microbiologie) van de American Society for Microbiology of andere naslagwerken op het gebied van mycologie voor aanbevolen procedures betreffende het transporteren en isoleren van gisten. Snelle chromogene tests zijn gebaseerd op de aanwezigheid van vooraf gevormde enzymen in het onbekende organisme.^{2,3,4} Daarom wordt het testresultaat beïnvloed door het plaatmedium waarop het organisme groeit (vanwege de inductie van verschillende enzymen door verschillende media). Het panel voor snelle gistidentificatie is gebaseerd op het gebruik van Sabouraud dextrose agar (hetzij de standaard-agar of de modificatie van Emmons). De aanwezigheid van antibiotica in het groeimiddel is geen kritische variabele. Desondanks mogen geen media worden gebruikt die bloed, Yeast Extract-Malt Extract (YM) Agar en Inhibitory Mold Agar (IMA) bevatten.

GELEVERDE MATERIALEN

Panels voor snelle gistidentificatie (B1017-70)

Werkblad

Procedurehandleiding

Diagram Kwaliteitscontrole

BENODIGD, MAAR NIET MEEGELEVERD MATERIAAL

Inoculatiewater (B1015-2)

0.05N natriumhydroxide (B1015-3)

Peptidasereagens (B1012-30B)

Standaard voor de troebelheid van gist (B1015-18)

Afdektays (B1010-56B)

Codeboek MicroScan gistbiotype (B1014-1A)

Ent-ogen

Sabouraud dextrose agar-platen

Wervelmixer

Pipet van 50 µL met punten

Incubator (35-37 °C), niet-CO₂

Organismen voor kwaliteitscontrole:

Candida albicans ATCC 66027*

Candida kefyr ATCC 66028

Candida tropicalis ATCC 66029

Cryptococcus albidus ATCC 66030

Cryptococcus neoformans ATCC 66031

Candida glabrata ATCC 66032

Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

PROCEDURE

Vorbereiding van panels

1. Haal de benodigde panels uit de opslag. **Panels mogen niet worden gebruikt wanneer het dehydratiemiddel afwezig of defect is of wanneer de verpakking beschadigd is (niet dicht, geperforeerd of gescheurd).**
2. Snijd de verpakking open en haal het panel eruit. Neem het panel onmiddellijk uit de folieverpakking. Laat de panels voorafgaand aan rehydratie acclimatiseren tot kamertemperatuur. Panels mogen worden gestapeld als er een schone afdektray bovenop wordt gelegd.

Vorbereiding van het inoculum

1. Inoculeer het panel voor snelle gistidentificatie met een actief groeiend organisme. Kolonies van een Sabouraud dextrose agar-plaat voor primaire isolatie kunnen worden gebruikt op voorwaarde dat er voldoende groeisel aanwezig is. Plaats indien nodig een subcultuur van het gist-isolaat op een Sabouraud dextrose agar-plaat en laat dit incuberen totdat er zich voldoende groeisel heeft gevormd. Het worden aanbevolen om gedurende 48 uur bij 30 °C of gedurende 48 tot 72 uur bij 25 °C (kamertemperatuur) te laten incuberen.

Opmerking: culturen die gedurende meer dan 48 uur bij 30 °C hebben geïncubeerd, mogen alleen worden gebruikt wanneer aanvullende incubatie vereist is om een bruikbare kweek te verkrijgen.

2. Verwijder met behulp van een steriel wattenstaafje of een ent-oog eventueel groeisel dat zich op de agarplaat heeft gevormd en emulgeer in 3 mL innoculatiewater (geautoclaveerd gedeïoniseerd water in een buisje van 13 x 84 mm of 13 x 100 mm). Elke suspensie moet worden vergeleken en moet gelijk zijn aan de MicroScan-standaard voor de troebelheid van gist. Bij het vergelijken van de test-inoculumsuspensie en de standaard voor de troebelheid van gist moet gebruik worden gemaakt van een geschikte lichtbron, en moeten de buisjes worden vergeleken met een witte kaart met daarop contrasterende zwarte strepen.

Opmerking: pas op dat er samen met het organisme geen agarmedium wordt verwijderd.

3. Meng de suspensie of laat deze wervelen totdat ze een homogene substantie vormt. Sommige giststammen lossen niet gemakkelijk op in water. Indien het wervelen niet resulteert in een homogene suspensie, laat u de suspensie 10-15 minuten rusten alvorens het wervelen te herhalen. Als de suspensie nog steeds klonters bevat, laat u de klonters bezinken op de bodem van het buisje en gebruikt u de supernatant om het gistpanel te inoculeren. De troebelheid van de supernatant moet voldoen aan de MicroScan-standaard voor de troebelheid van gist. Is dit niet het geval, dan brengt u meer groeisel over in het innoculatiewater en herhaalt u de bovenstaande procedure.

Opmerking: u mag klonters van cellen NIET met een pipet overhevelen naar het gistpanel.

Panel-inoculatie

1. Label het panel met het specimennummer.
2. Voeg 50 µL gistsuspensie toe aan elke well die substraat bevat, alsmede de controlewells BNAC en NPC. Het wordt niet aangeraden om voor de inoculatie gebruik te maken van een Pasteur-pipet.

Tabel 1-1, substraten

Substraten	Afk.	Substraten	Afk.
Hydroxyproline-β-naftylamide	HPR	L-histidine-β-naftylamide	HIS
L-isoleucine-β-naftylamide	ILE	Sucrose	SUC1
L-proline-β-naftylamide	PRO	Sucrose	SUC2 ¹
L-tyrosine-β-naftylamide	TYR	Trehalose	TRE
Glycine β-naftylamide	GLY	p-nitrofenyl-α-D-glucopyranoside	AGL1
Glycylglycine-β-naftylamide	GGLY	p-nitrofenyl-α-D-glucopyranoside	AGL2 ¹
Glycyl-L-arginine-4-methoxy-β-naftylamide	GLAR	p-nitrofenyl-β-D-glucopyranoside	BGL
Glycyl-L-proline-4-methoxy-β-naftylamide	GLPR	o-nitrofenyl-β-D-galactopyranoside	BGAL
L-arginyl-L-arginine-β-naftylamide	AARG	p-nitrofenyl-β-D-fucopyranoside	BDF

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

Substraten	Afk.	Substraten	Afk.
L-lysyl-L-alanine-4-methoxy- β -naftylamide	LYAL	p-nitrofenyl- α -D-galactopyranoside	AGAL
L-alanine-4-methoxy- β -naftylamide	ALA	p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine	NAG
L-seryl-L-tyrosine- β -naftylamide	STY	p-nitrofenyl- β -D-cellobiose	CELL
Ureum	URE	p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-galactosaminide	NGAL
3-indoxylfosfaat	IDX		

1. Er worden verschillende samenstellingen van dezelfde substraten gebruikt.

3. Nadat het panel is geïnoculeerd met 50 μ L inoculum, tikt u lichtjes op elke kant van het panel om voor een goede vermenging met het substraat te zorgen.

Opmerking: wanneer het panel moet worden afgelezen op de WalkAway of autoSCAN-4, moet de LOC-well eveneens worden geïnoculeerd.

Incubatie

1. Stapel panels in groepen van 3 tot 5 exemplaren met een afdektray op het bovenste panel om verdamping te voorkomen.
2. Incubeer de geïnoculeerde panels gedurende 4 uur bij 35-37 °C in een niet-CO₂-incubator.

De panels aflezen

1. Neem het peptidasereagens ten minste 30 minuten vóór het aflezen van de panels uit de koelkast. Het peptidasereagens kan bij 4 °C neerslaan, maar het zal opnieuw oplossen bij kamertemperatuur. Stel het peptidasereagens niet bloot aan hogere temperaturen om het opnieuw oplossen van het kristallijne precipitaat te bespoedigen, aangezien hoge temperaturen ertoe leiden dat het reagens in kwaliteit achteruitgaat.
2. Lees de panels met behulp van het licht dat wordt gereflecteerd door een witte achtergrond.
3. Na 4 uur incubatie voegt u de peptidase- en natriumhydroxide- (NaOH) reagentia toe aan de betreffende wells.

- A. Voeg **1 druppel** peptidasereagens toe aan de BNAC-, HPR-, ILE-, PRO-, TYR-, GLY-, GGLY-, GLAR-, GLPR-, AARG-, LYAL-, ALA-, STY- en HIS-wells. Wacht 30 seconden tot er zich een kleur heeft gevormd alvorens de resultaten vast te leggen. Resultaten moeten binnen 3 minuten na het toevoegen van reagens worden vastgelegd. De manifestatie van ELKE schakering van roze of rood in de oplossing, hetzij in de volledige well of in een gedeelte hiervan, wordt als positief geïnterpreteerd. Kleuren moeten worden vergeleken met de BNAC-well. Sommige wells kunnen donkerder oranje zijn dan de BNAC-well. Deze moeten als negatief worden vastgelegd. Reacties mogen alleen als positief worden beoordeeld wanneer er roze of rood te zien is in de oplossing. De kleur in deze wells zal na verloop van tijd donkerder worden. Een 'negatieve' gele kleur kan veranderen in een donkerder oranje. Dit moet worden opgevat als een negatieve reactie.

Opmerking: na de toevoeging van peptidase aan de BNAC-well zou deze een gele kleur moeten hebben. Is er sprake van roze of rood, dan mag het peptidasereagens niet worden gebruikt.

- B. Voeg **1 druppel** 0.05N NaOH toe aan AGL2-, BDF-, AGAL-, NPC-, NAG-, CELL- en NGAL-wells. Wacht minstens 5 seconden maar niet langer dan 5 minuten alvorens de resultaten vast te leggen. Elke schakering van geel dient als een positieve uitslag te worden geregistreerd. Vergelijk de wells die substraat bevatten met de NPC-well.

Opmerking: deze wells kunnen donkerder lijken dan de NPC-well. Dit moet als negatief worden geïnterpreteerd, maar een gele kleur moet zichtbaar zijn om van een positief resultaat te kunnen spreken.

4. Er worden twee controlewells verstrekt om te helpen bij het interpreteren van de reacties.
 - A. BNAC = β -naftylamidecontrole. Na toevoeging van peptidasereagens zal deze well een gele kleur vertonen.
 - B. NPC = nitrofenylcontrole. Deze well zou kleurloos moeten zijn.
5. Raadpleeg het gedeelte RESULTATEN voor hulp bij de biochemische interpretatie.

Opmerking: de WalkAway leest wells die vooraf geen reagentia vereisen (ter voorkoming van gewijzigde resultaten die optreden doordat reagensdampen opgesloten raken onder het deksel van de tray). Daardoor kunnen biochemische reacties niet handmatig worden geverifieerd.

RESULTATEN

Interpretaties van het substraat

Bron	Reagens	Positief	Negatief
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Voeg 1 druppel van het peptidasereagens toe. Wacht minstens 30 seconden (maar niet langer dan 3 minuten) zodat er zich kleuren kunnen vormen.	Een schakering van roze, rood of magenta in de oplossing ¹	Geel tot oranje
SUC1 SUC2 TRE		Elke schakering van bruin of geel	Paars
AGL1 BGL BGAL	Vergelijk dit resultaat met de NPC-controlewell.	Elke schakering van geel ²	Helder
URE		Roze tot magenta	Helder/beige tot geel
IDX		Elke schakering van blauw	Helder
AGL2 BDF AGAL NAG CELL NGAL	Voeg 1 druppel 0,05 N NaOH toe. Wacht minstens 5 seconden maar niet langer dan 5 minuten alvorens het resultaat vast te leggen. Vergelijk dit resultaat met de NPC-controlewell.	Elke schakering van geel ²	Helder

1. Mogelijk is er niet overal in de well een positieve kleur aanwezig.

2. Een roze kleur kan zichtbaar zijn bij sommige gisten. Dit moet worden geïnterpreteerd als een positieve reactie.

PRINCIPES VAN IDENTIFICATIEREACTIES

Aminozuur- β -naftylamide (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) - Wanneer de stof wordt gehydrolyseerd door het juiste enzym (meestal een aminozuur-arylamidase), komt er β -naftylamine vrij. Het β -naftylamine wordt gedetecteerd door toevoeging van p-dimethylaminocinnamaldehyde (in het peptidasereagens), dat een complex vormt met een roze tot paarse kleur.

Opmerking: het enzym dat een aminozuur- β -naftylamide splitst, is een aminozuur-arylamidase. De term 'aminopeptidase' wordt vaak als een synoniem gebruikt voor arylamidase maar verwijst feitelijk naar een enzym met een andere specificiteit (een aminopeptidase maakt het N-uiteinde-aminozuur los van een peptide). Een arylamidase en een aminopeptidase kunnen dezelfde aminozuur- β -naftylamide laten hydrolyseren. Daarom is het nog niet zeker dat het panel verschillende en unieke enzymen meet. Een enkele arylamidase kan meerdere aminozuur- β -naftylamiden laten hydrolyseren.

Koolhydraten (SUC1, SUC2, TRE) - Het gebruik van sucrose en trehalose resulteert in een daling van de pH, wat er op zijn beurt toe leidt dat het rood van de chlorofenol verandert (van paars tot geel). Deze koolhydraatreacties zijn selectief en wijken mogelijk af van conventionele reacties.

Nitrofenylsubstraten (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) - Indien het juiste enzym aanwezig is, komt door de splitsing van het substraat ortho- of para-nitrofenol vrij. Bij een alkaline pH hebben deze verbindingen een gele kleur. Wanneer de reactie optreedt bij een zure pH, moet na de incubatie NaOH worden toegevoegd voordat de resultaten kunnen worden uitgelezen. De wells kunnen ofwel kleurloos of lichtgeel zijn voordat de natriumhydroxide wordt toegevoegd.

Indoxylfosfatase (IDX) - Indoxylfosfaat wordt afgesplitst door een fosfatase, waardoor indoxyl vrijkomt. Het indoxyl bindt zich aan zuurstof en vormt indigoblauw, een onoplosbaar blauw of blauw-grijs precipitaat.

Ureum (URE) - Ureum wordt opgesplitst door urease om ammoniak en kooldioxide te vormen. De ammoniak (in de vorm van ammoniumcarbonaat) veroorzaakt een toename in de pH, wat zichtbaar wordt doordat fenolrood verandert van geel in rood.

IDENTIFICATIE VAN ORGANISMEN

Het MicroScan-biotypencodeboek voor snelle gist wordt gebruikt voor het identificeren van onbekende testorganismen. Dit codeboek is ontleend aan de database van MicroScan voor de tests die zijn opgenomen in het identificatiepanel. Het gistcodeboek is gebaseerd op een computeranalyse van de 27 tests op het snel panel voor gistidentificatie. De testresultaten worden omgezet in een biotypenummer van 9 cijfers waarvoor het codeboek een soortidentificatie en een cumulatieve

relatieve identificatiewaarschijnlijkheid vermeldt. Alle mogelijke identificaties worden afgedrukt, aflopend gerangschikt volgens de waarschijnlijkheid en met een cumulatief totaal van maximaal 99,9%.

Als er een biotypenummer optreedt dat niet wordt vermeld in het codeboek, moet in eerste instantie worden gedacht aan een procedurele fout, bijvoorbeeld een geval waarin het biotypenummer onjuist is toegevoegd of waarin een reactie foutief is geregistreerd. Als het biotypenummer correct is, moet worden nagegaan of er sprake is van een gemengde cultuur en moet het organisme opnieuw worden getest, met een speciale nadruk op het gebruik van een voldoende troebele celsuspensie. Wanneer opnieuw testen dezelfde resultaten oplevert, dient de Biotype Lookup Service op de website van Beckman Coulter te worden geraadpleegd of dient u advies in te winnen van uw plaatselijke distributeur.

PROCEDUREBEPERKINGEN

1. Snelle panels voor gistidentificatie zijn ontwikkeld voor het identificeren van gist en gistachtige organismen (bijv. *Prototheca*). Ga voorzichtig om met organismen die een bovenmatige hoeveelheid schimmeldraad produceren.
2. Indien er meer dan één soortidentificatie is vermeld voor een bepaald biotypenummer, zijn er wellicht aanvullende tests nodig. Tot geaccepteerde identificatieprocedures voor gist en gistachtige organismen behoren koloniale morfologie, groei bij verhoogde temperaturen, vorming van pigment en kleur op fenoloxidase-agar. Ook microscopische morfologie op media die zijn ontwikkeld om een typische morfologie teweeg te brengen, kan worden gebruikt om deze organismen gemakkelijker te herkennen. Raadpleeg de betreffende mycologiereferentieprocedures.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. De chromogene resultaten kunnen variëren als gevolg van het feit dat er bovenmatig sterke of juist extreem weinig inoculatie plaatsvindt in het systeem. Elk inoculum moet worden vergeleken met de troebelheidsstandaard om voor de juiste concentratie inoculum te zorgen die is vereist voor optimale prestaties.

KWALITEITSCONTROLE

De aanvaardbaarheid van de identificatiestoffen moet worden gecontroleerd door organismen te testen waarvan de reacties bekend zijn. De resultaten van elke reactie bij de aanbevolen MicroScan-controleorganismen vindt u in het schema voor kwaliteitscontrole dat in deze handleiding is opgenomen.

Kwaliteitscontrole-diagram voor snelle gist-identificatiesubstraten

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

De gearceerde kwaliteitscontrole (QC)-specificaties in de bovenstaande tabel zullen worden geïmplementeerd in LabPro-softwareversies ≥1.90.

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
2. Er kan een positief resultaat worden verkregen met *Rhodotorula rubra*, ATCC 66034.
3. Er kan een negatief resultaat worden verkregen met *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
4. Voor het uitlezen van het instrument is wellicht visuele verificatie nodig.
5. Er kan een positief resultaat worden verkregen met *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Opmerking: organismen voor kwaliteitscontrole worden geselecteerd om voor positieve/negatieve reacties bij alle identificatiestoffen te zorgen. Als gevolg hiervan kan de identificatie van organismen afwijken van de identificatie die wordt

vermeld in het kwaliteitscontrole (QC)-diagram. De aanvaardbaarheid van de productprestaties moet worden bepaald door testresultaten te vergelijken, niet door middel van identificatie.

GARANTIEVERKLARING

Het systeem wordt gedekt en valt onder de voorwaarden van de garantie inbegrepen in uw contractuele overeenkomst voor het systeem of de bijbehorende reagentia. De klant is verantwoordelijk voor routineprocedures van preventief onderhoud. Reparaties die voortkomen uit het niet uitvoeren van deze onderhoudsprocedures op de aangegeven tijdsintervallen vinden plaats volgens het goeddunken van Beckman Coulter en voor rekening van de klant.

Verklaring van symbolen

Verklaring van symbolen			
Symbool	Titel van symbool	Beschrijving van norm	Standard
	Niet hergebruiken	Geeft aan dat een medisch apparaat bedoeld is voor eenmalig gebruik, voor gebruik bij één patiënt, gedurende één procedure.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Uiterste gebruiksdatum	De datum waarna het medische hulpmiddel niet meer mag worden gebruikt.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Batchcode	Geeft de batchcode van de fabrikant aan, waarmee de batch of partij kan worden geïdentificeerd.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Catalogusnummer	Geeft het catalogusnummer van de fabrikant aan, waarmee een medisch hulpmiddel kan worden geïdentificeerd.	ISO 15223-1, clause 5.1.6
	Fabrikant	De fabrikant van het medische hulpmiddel volgens EU-richtlijnen 90/385/EEG, 93/42/EEG en 98/79/EG.	ISO 15223-1, clause 5.1.1
	Productiedatum	Geeft de datum aan waarop het medische hulpmiddel is geproduceerd.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Gemachtigde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap	Geeft de gemachtigde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap aan.	ISO 15223-1, clause 5.1.2
	Voldoende inhoud voor <n> tests	Geeft het totaal aantal IVD-tests aan dat kan worden uitgevoerd met de IVD. (Doorgaans aangegeven op reagenskit).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Medisch apparaat voor <i>in-vitro</i> diagnostiek	Geeft een medisch apparaat aan dat is bedoeld voor gebruik als medisch <i>in vitro</i> diagnoseapparaat.	ISO 15223-1, clause 5.5.1
	Temperatuurbeperring	Geeft de temperatuurlimieten aan waaraan een medisch hulpmiddel veilig kan worden blootgesteld.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Gebruiksaanwijzingen raadplegen	Geeft aan dat de gebruiker de gebruiksaanwijzingen dient te raadplegen.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE-markering	Regelmarkering Europese conformiteit	n.v.t.
	Inhoud	n.v.t.	n.v.t.
	Inhoud (pakket)	Antimicrobiële stof (afkorting)	n.v.t.
	Inhoud (pakket)	Identificerende stof (afkorting)	n.v.t.
	Veiligheidsinformatieblad	Geeft een veiligheidsinformatieblad aan.	n.v.t.
	Made in USA	n.v.t.	n.v.t.
	Alleen voor export	n.v.t.	n.v.t.
	Hersamenstellingsvolume	n.v.t.	n.v.t.

Verklaring van symbolen			
Symbool	Titel van symbool	Beschrijving van norm	Standard
	Breekbaar, voorzichtig hanteren	Geeft een medisch hulpmiddel aan dat kan breken of beschadigd kan raken als het niet voorzichtig gehanteerd wordt.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Deze kant boven	Geeft de juiste staande positie aan	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: Medische hulpmiddelen - Symbolen voor het gebruik met medische hulpmiddeletiketten, etikettering (labeling) en informatievoorziening - Deel 1: Algemene eisen.)			

Beckman Coulter, het gestileerde logo en de merken van Beckman Coulter-producten en -services in dit document zijn handelsmerken of gedeponeerde handelsmerken van Beckman Coulter, Inc. in de Verenigde Staten en andere landen.

MicroScan

Hướng dẫn quy trình định danh nhanh nấm men

[REF] B1017-70

MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

Panel định danh nhanh nấm men được thiết kế để định danh nhanh nấm men và các loài giống nấm men được phân lập từ các mẫu xét nghiệm lâm sàng.

TÓM TẮT VÀ NGUYÊN TẮC

Các xét nghiệm sinh màu và xét nghiệm thông thường tùy chỉnh được dùng để định danh các loài nấm men được phân lập khỏi mẫu xét nghiệm lâm sàng. Panel định danh nhanh nấm men là một panel pha loãng vi lượng 96 giếng sử dụng 27 cơ chất đã khử nước (Tham khảo Bảng 1-1). Huyền phù nặng của nấm men trong nước đã hấp tiệt trùng được dùng để thủy hóa lại cơ chất. Định danh nấm men sau khi ủ panel ở nhiệt độ 35–37°C trong vòng 4 giờ.

CẢNH BÁO VÀ THẬN TRỌNG

1. Panel định danh nhanh nấm men chỉ dùng để chẩn đoán *in vitro*.
2. Không để thuốc thử Peptidase, Natri hiđroxit hoặc 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. 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

Bảo quản panel và thuốc thử Peptidase 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

Tham khảo American Society for Microbiology Manual of Clinical Microbiology¹ (Hướng dẫn vi sinh lâm sàng của Hiệp hội vi sinh Hoa Kỳ) hoặc sách hướng dẫn tham khảo về nấm khác để biết quy trình vận chuyển và phân lập nấm men được khuyến nghị. Xét nghiệm sinh màu nhanh được dựa trên sự có mặt của các enzym tạo trước trong sinh vật chưa xác định.^{2,3,4} Do đó, môi trường đĩa mà sinh vật sinh trưởng sẽ tác động đến kết quả xét nghiệm vì các enzym khác nhau sẽ kích thích theo các môi trường khác nhau. Panel định danh nhanh nấm men được dựa trên việc sử dụng Thạch Sabouraud Dextrose (thạch Emmons chuẩn hoặc điều chỉnh). Sự có mặt của chất kháng sinh trong môi trường sinh trưởng không phải là một biến quan trọng. Tuy nhiên, không nên sử dụng môi trường chứa máu, Thạch dịch chiết mạch nha-dịch chiết nấm men (YM) và Thạch mốc ức chế (IMA).

VẬT LIỆU ĐƯỢC CUNG CẤP

Panel định danh nhanh nấm men (B1017–70)

Bảng tính

Hướng dẫn quy trình

Bảng kiểm soát chất lượng

VẬT LIỆU CẦN THIẾT KHÔNG ĐƯỢC CUNG CẤP

Nước cấy truyền (B1015–2)

Natri hiđroxit 0,05N (B1015–3)

Thuốc thử Peptidase (B1012–30B)

Ống độ đục chuẩn nấm men (B1015–18)

Khay phủ (B1010–56B)

Sổ mã hóa kiểu sinh học nấm men của MicroScan (B1014–1A)

Que cấy đầu tròn

Đĩa thạch Sabouraud Dextrose

Máy trộn vortex

Pipet 50 µL có đầu hút

Máy ủ (35–37°C), không CO₂

Sinh vật kiểm soát chất lượng:
Candida albicans ATCC 66027*
Candida kefyr ATCC 66028
Candida tropicalis ATCC 66029
Cryptococcus albidus ATCC 66030
Cryptococcus neoformans ATCC 66031
Candida glabrata ATCC 66032
Cryptococcus uniguttulatus ATCC 66033

QUY TRÌNH
Chuẩn bị Panel

- 1. Lấy panel cần sử dụng ra khỏi nơi bảo quản. **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. Cấy truyền Panel định danh nhanh nấm men bằng sinh vật sinh trưởng tốt. Có thể sử dụng các khuẩn lạc từ đĩa thạch Sabouraud Dextrose phân lập chính nếu nhận thấy độ sinh trưởng vừa đủ. Nếu cần, hãy nuôi cấy bậc hai nấm men phân lập trên đĩa thạch Sabouraud Dextrose và ủ cho đến khi nhận thấy sinh trưởng đủ. Nên ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 30°C hoặc 48 đến 72 giờ ở nhiệt độ 25°C (nhiệt độ phòng).

GHI CHÚ: Chỉ ủ các panel nuôi cấy trên 48 giờ ở 30°C nếu cần ủ thêm để đạt được sự sinh trưởng phù hợp.

- 2. Dùng tăm bông hoặc que cấy đầu tròn vô khuẩn để lấy sinh vật sinh trưởng từ đĩa thạch và tạo nhũ tương trong 3 mL Nước cấy truyền (nước khử ion đã hấp tiệt trùng trong ống 13 x 84 mm hoặc 13 x 100 mm). Phải so sánh từng huyền phù và huyền phù phải tương đương với Độ đục chuẩn nấm men của MicroScan. Phải so sánh huyền phù môi trường cấy truyền xét nghiệm với Độ đục chuẩn nấm men bằng nguồn sáng phù hợp bằng cách so sánh các ống với một thẻ màu trắng có các đường kẻ đen tương phản.

GHI CHÚ: Hãy thận trọng để đảm bảo rằng sinh vật không bị dính môi trường thạch.

- 3. Lắc hoặc trộn huyền phù cho đến khi đồng nhất. Một số chủng nấm men khó phân tán trong nước. Nếu huyền phù không đồng nhất sau khi lắc, hãy để yên huyền phù trong 10–15 phút rồi lắc lại. Nếu huyền phù vẫn vón cục, hãy để các cục vón lắng xuống đáy ống và sử dụng phần dịch nổi để cấy truyền panel nấm men. Độ đục của phần dịch nổi phải khớp với Độ đục chuẩn nấm men của MicroScan. Nếu không, hãy truyền thêm sinh vật sinh trưởng vào Nước cấy truyền và lặp lại quy trình trên.

GHI CHÚ: KHÔNG hút các tế bào vón cục vào panel nấm men.

Cấy truyền Panel

- 1. Dán nhãn panel bằng số mẫu xét nghiệm.
- 2. Thêm 50 µL huyền phù nấm men vào từng giếng chứa cơ chất và hai giếng kiểm chuẩn BNAC và NPC. Không nên sử dụng pipet Pasteur để cấy truyền.

Bảng 1-1, Cơ chất

Cơ chất	Chữ viết tắt	Cơ chất	Chữ viết tắt
Hydroxyproline-β-Naphthylamide	HPR	L-Histidine-β-Naphthylamide	HIS
L-Isoleucine-β-Naphthylamide	ILE	Sucrose	SUC1
L-Proline-β-Naphthylamide	PRO	Sucrose	SUC2 ¹
L-Tyrosine-β-Naphthylamide	TYR	Trehalose	TRE
Glycine β-Naphthylamide	GLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL1
Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY	p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL2 ¹
Glycyl-L-Arginine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	GLAR	p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranoside	BGL
Glycyl-L-Proline-4-Methoxy-β-Naphthylamide	GLPR	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	BGAL
L-Arginyl-L-Arginine-β-Naphthylamide	AARG	p-Nitrophenyl-β-D-Fucopyranoside	BDF
L-Lysyl-L-Alanine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	LYAL	p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranoside	AGAL
L-Alanine-4-Methoxy-β-Naphthylamide	ALA	p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamine	NAG
L-Seryl-L-Tyrosine-β-Naphthylamide	STY	p-Nitrophenyl-β-D-Cellobiose	CELL
Urê	URE	p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Galactosaminide	NGAL
3-Indoxyl Phosphate	IDX		

1. Sử dụng công thức khác nhau của cùng một Cơ chất.

*Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection), Manassas, VA USA
C29879-AB

- 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.

GHI CHÚ: Nếu đọc panel trên thiết bị WalkAway hoặc autoSCAN-4 thì phải cấy truyền cả giếng LOC.

Ủ

- Xếp các panel thành từng nhóm 3 đến 5 panel, đặt panel trên cùng bằng khay phủ để tránh bay hơi.
- Ủ các panel đã cấy truyền trong 4 giờ ở nhiệt độ $35\text{--}37^\circ\text{C}$ trong buồng ủ không có CO_2 .

Đọc panel

- 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.
- Đọc các panel bằng ánh sáng phản chiếu từ một nền trắng.
- Sau khi ủ 4 giờ, hãy thêm thuốc thử Peptidase và Natri hiđroxit (NaOH) vào các giếng phù hợp.

- Thêm **1 giọt** thuốc thử Peptidase vào các giếng BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY và HIS. Để màu phát triển trong 30 giây, sau đó ghi lại kết quả. Phải ghi lại kết quả trong vòng 3 phút sau khi thêm thuốc thử. **BẤT KỲ** sắc hồng hoặc đỏ nào xuất hiện trong dung dịch của toàn bộ giếng hoặc bất kỳ phần nào của giếng phải được diễn giải là dương tính. Phải so sánh các màu với giếng BNAC. Một số giếng có thể bắt màu cam đậm hơn giếng BNAC. Phải ghi kết quả của những giếng này là âm tính. Các phản ứng chỉ dương tính khi có màu hồng hoặc đỏ trong dung dịch. Màu trong các giếng này sẽ đậm dần lên. Màu vàng âm tính có thể trở thành màu cam đậm hơn. Phải diễn giải kết quả này là phản ứng âm tính.

GHI CHÚ: Sau khi thêm Peptidase vào giếng BNAC, giếng này phải chuyển sang màu vàng. Nếu có sắc hồng hoặc đỏ, phải thải bỏ thuốc thử Peptidase.

- Thêm **1 giọt** NaOH 0,05N vào các giếng AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL và NGAL. Đọc kết quả sau ít nhất 5 giây nhưng không được quá 5 phút. Mọi sắc vàng phải được ghi là dương tính. So sánh các giếng chứa cơ chất với giếng NPC.

GHI CHÚ: Các giếng này có thể đậm hơn giếng NPC. Phải diễn giải kết quả này là âm tính nhưng phải xuất hiện cả màu vàng mới được kết luận là dương tính.

- 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.
 - NPC = chất kiểm chuẩn nitrophenyl. Giếng này phải không có màu.
- Tham khảo phần KẾT QUẢ để hỗ trợ quá trình diễn giải kết quả sinh hóa.

GHI CHÚ: WalkAway đọc các giếng không yêu cầu thuốc thử trước để tránh trường hợp kết quả bị thay đổi do hơi của thuốc thử có thể đọng dưới nắp đáy khay và không thể xác minh các phản ứng sinh hóa theo cách thủ công.

KẾT QUẢ

Diễn giải cơ chất

Giếng	Thuốc thử	Dương tính	Âm tính
HPR ILE PRO TYR GLY GGLY GLAR GLPR AARG LYAL ALA STY HIS	Thêm 1 giọt thuốc thử Peptidase. Để phản ứng màu phát triển trong ít nhất 30 giây, nhưng không quá 3 phút.	Mọi sắc Hồng, Đỏ đến Đỏ tươi trong dung dịch ¹	Vàng đến cam
SUC1 SUC2 TRE		Mọi sắc Nâu hoặc Vàng	Tím
AGL1 BGL BGAL URE	So sánh với giếng kiểm chuẩn NPC.	Mọi sắc vàng ²	Trong
		Hồng đến Đỏ tươi	Trong suốt/Be đến Vàng

Giếng	Thuốc thử	Dương tính	Âm tính
IDX		Mọi sắc Lam	Trong
AGL2	Thêm 1 giọt NaOH 0,05 N. Đọc kết quả sau ít nhất 5 giây nhưng không được quá 5 phút. So sánh với giếng kiểm chuẩn NPC.	Mọi sắc Vàng ²	Trong
BDF			
AGAL			
NAG			
CELL			
NGAL			

1. Màu dương tính có thể không xuất hiện trong toàn bộ giếng.
2. Một số nấm men có thể bắt màu hồng. Phải coi đây là phản ứng dương tính.

NGUYÊN LÝ CỦA CÁC PHẢN ỨNG ĐỊNH DANH

Cơ chất axit amin β -naphthylamide (HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) – Khi cơ chất được thủy phân bằng enzym phù hợp (thường là một axit amin arylamidase), β -naphthylamine sẽ được giải phóng. Nhận biết β -naphthylamine bằng cách thêm p-dimethylaminocinnamaldehyde (trong thuốc thử Peptidase) để tạo ra một phức chất màu hồng đến tía.

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.

Hydrat-cacbon (SUC1, SUC2, TRE) – Việc sử dụng sucrose và trehalose làm cho độ pH giảm khiến chlorophenol đổi màu từ tía sang vàng. Các phản ứng hydrat-cacbon này là chọn lọc và có thể không tuân theo các phản ứng thông thường.

Cơ chất Nitrophenyl (AGL1, BGL, BGAL, AGL2, BDF, AGAL, NAG, CELL, NGAL) – Nếu xuất hiện enzym phù hợp, cơ chất bị tách ra, giải phóng ortho-nitrophenol hoặc para-nitrophenol. Ở độ pH kiềm, các hợp chất này có màu vàng. Nếu phản ứng xuất hiện trong môi trường pH axit thì phải thêm NaOH sau khi ủ để có thể đọc kết quả. Các giếng này có thể không có màu hoặc màu vàng nhạt trước khi thêm natri hiđroxit.

Indoxyl Phosphatase (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-xám không hòa tan.

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 phenol đổi màu từ vàng sang đỏ.

ĐỊNH DANH SINH VẬT

Sổ mã hóa kiểu sinh học nấm men 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 MicroScan cho các xét nghiệm được đưa vào panel định danh. Sổ mã hóa nấm men được dựa trên phân tích bằng máy tính của 27 xét nghiệm trên Panel định danh nấm men. Kết quả xét nghiệm được chuyển đổi thành số kiểu sinh học gồm 9 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. Ví dụ: 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 phù 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. Panel định danh nấm men được thiết kế để định danh nấm men hoặc các sinh vật giống nấm men (ví dụ: *Prototheca*). Phải cẩn trọng với các sinh vật tạo ra quá nhiều sợi nấm.
2. Nếu một số kiểu sinh học cụ thể có nhiều định danh loài, thì có thể cần xét nghiệm bổ sung. Quy trình định danh nấm men và sinh vật giống nấm men được chấp nhận bao gồm hình thái khuẩn lạc, sự sinh trưởng ở nhiệt độ gia tăng, việc hình thành sắc tố và màu trên thạch phenoloxidase. Hình thái soi trên kính hiển vi trên một môi trường được thiết kế để suy ra hình thái thông thường cũng có thể hỗ trợ định danh các sinh vật này. Tham khảo quy trình tham chiếu phù hợp về nấm.^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}
3. Kết quả sinh màu khác nhau có thể xảy ra do hệ thống cấy truyền non hoặc già. Phải so sánh từng môi trường cấy truyền với độ đục chuẩn để đạt được nồng độ môi trường cấy truyền chính xác cho hiệu quả xét nghiệm tối ưu.

KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Phải kiểm tra khả năng chấp nhận của Cơ chất định danh bằng cách xét nghiệm các sinh vật có phản ứng đã biết. Kết quả của từng phản ứng cho sinh vật kiểm chuẩn được MicroScan khuyến nghị có trong Bảng kiểm soát chất lượng trong hướng dẫn này.

Cơ chất định danh nhanh nấm men trong bảng kiểm soát chất lượng

	<i>Candida albicans</i> ATCC 66027 ¹	<i>Candida kefyr</i> ATCC 66028	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 66029	<i>Cryptococcus albidus</i> ATCC 66030	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 66031	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ATCC 66033
HPR	+	V	V	V	-	V	V
ILE ²	V	V	V	V	-	V	V
PRO	+	V	V	V	-	V	V
TYR	V	V	+	V	-	V	V
GLY	V	-	+	V	V	V	V
GGLY	V	V	+	V	-	V	V
GLAR	+	V	V	V	-	V	V
GLPR ³	V	V	+	V	V	V	V
AARG	-	V	V	+	V	V	V
LYAL	-	V	V	V	V	V	+
ALA	V	V	V	V	-	+	V
STY	-	V	V	V	V	V	+
URE	-	V	V	V	+	V	V
IDX	V	V	+ ⁴	V	-	V	V
HIS	V	V	V	V	-	+	V
SUC1	-	+	V	V	V	V	V
SUC2	-	+	V	V	V	V	V
TRE	-	V	V	V	V	+	V
AGL1	-	V	+	V	V	V	V
BGL	-	+	V	V	V	V	V
BGAL	-	+	V	V	V	V	V
AGL2	V	-	V	+	V	V	V
BDF	-	+	V	V	V	V	V
AGAL ⁵	-	V	V	V	V	V	V
NAG	V	-	V	V	+	V	V
CELL	-	V	V	+	V	V	V
NGAL	+	-	V	V	V	V	V

Các thông số QC được tô sáng trong bảng trên sẽ được triển khai trong phần mềm LabPro phiên bản ≥1.9.

- 1. Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection), Manassas, VA USA
- 2. Có thể thu được kết quả dương tính với *Rhodoturulula rubra*, ATCC 66034.
- 3. Có thể thu được kết quả âm tính với *Candida lusitanae*, ATCC 66035.
- 4. Có thể cần kiểm tra lại bằng mắt kết quả đọc bằng thiết bị.
- 5. Có thể thu được kết quả dương tính với *Cryptococcus laurentii*, ATCC 66036.

Ghi chú: Các sinh vật Kiểm soát chất lượng được chọn để cung cấp phản ứng dương tính/âm tính cho tất cả cơ chất định danh. Do đó, định danh của sinh vật có thể khác với định danh được nêu trong bảng QC. Phải xác định khả năng chấp nhận hiệu quả của sản phẩm bằng cách so sánh kết quả xét nghiệm chứ không phải kết quả định danh.

TUYÊN BỐ BẢO HÀNH

Hệ thống được bảo hành và phải tuân theo các điều khoản bảo hành bao gồm trong thỏa thuận hợp đồng của bạn đối với hệ thống hoặc thuộc thử của hệ thống. Khách hàng chịu trách nhiệm về các quy trình bảo dưỡng dự phòng định kỳ. Beckman Coulter có quyền quyết định việc thực hiện các công việc sửa chữa phát sinh do không tiến hành những quy trình bảo trì này theo đúng khoảng thời gian quy định và khách hàng phải thanh toán chi phí sửa chữa đó.

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

Bảng chú giải các ký hiệu			
Ký hiệu	Tên ký hiệu	Mô tả về tiêu chuẩn	Chuẩn
	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
	Thẻ 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. Merz, W.G. and G.D. Roberts. 1996. Detection and Recovery of Fungi from Clinical Specimens. P.709-722. In P. R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Bobey, D.G., and G.M. Ederer. 1981. Rapid detection of yeast enzymes by using 4-methylumberyl substrates. J. Clin. Microbiol. 13:393.
3. Lee, K.L., M.E. Reza, R.R. Watson, and C.C. Campbell. 1975, Identification of yeast phase of pathogenic fungi by the specificity of their aminopeptidase(S). Sabouraudia 13:132.
4. Watson, R.R. 1976. Substrates Specificities of Aminopeptidase: A Specific Method of Microbial Differentiation, p. 1-14. In J.R. Norris, and D.W. Ribbons (ed.), Methods in Microbiology, Vol. 9, Academic Press, Inc., New York, NY.
5. Callaway, C.J., and L.D. Haley. 1978. Laboratory Methods in Medical Mycology, 4th ed. Centers for Disease control, Atlanta, GA.
6. Emmons, C.W., C.H. Binford, J.P. Utz, and K.J. Kwon-Chung. 1977. Medical Mycology, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
7. Koneman, E.W., G.D. Roberts, and S.F. Wright. 1985. Practical Laboratory Mycology, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
8. Kreger-van Rij, N.J.W (ed). 1984. The Yeast-A Taxonomic Study, 3rd ed. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
9. LaRone, D.H. 1987. Medically Important Fungi. A Guide to Identification. 2nd ed. Elsevier Science Publishing Co., New York, NY.
10. McGinnis, M.R. 1980. Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academic Press New York.
11. Pore, R.S. 1985, Prototheca Taxonomy. Mycopathol. 90:129-139.
12. Roberts, G.D. 1977. Laboratory identification of fungi, p. 147-160. In E.W. Koneman, and M.S. Britt (ed.), Clinical Microbiology. Health Education Resources, Inc., Bethesda, MD.
13. Warren, N.G., and K. C Hunter. 1996. Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance. P. 723-738. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (eds.), 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