

MICROGEN™ STAPH-ID SYSTEM

System identyfikacyjny dla gronkowców o znaczeniu klinicznym, weterynaryjnym i środowiskowym.

Instrukcja

MID 69 paski testowe 20 testów

Podręczny opis

POTWIERDZENIE	Wykonać: barwienie metodą Grama (Gram-dodatnie ziarniki układające się w grona), test na katalazę (wynik dodatni) oraz test aglutynacji lateksowej. Zanotować obecność pigmentacji kolonii.
INOKULUM	Pojedyncza kolonia w podłożu do zawiesin.
INOKULACJA	3 - 4 krople (100 µl) na studzienkę.
NAWARSTWIENIE OLEJEM MINERALNYM	Studzienki 10 i 11 – ureaza i arginina.
CZAS INKUBACJI	18 - 24 godz.
TEMPERATURA	35 - 37°C
WSTĘPNE ODCZYTY	Odczytać wszystkie testy i zapisać zmianę barwy.
DODAWANE ODCZYNNIKI	Studzienka 9: azotany – dodać 1 kroplę odczynnika Nitrate A i 1 kroplę odczynnika Nitrate B po odczytaniu testu na β-glukuronidazę. Odczytać test po 30 – 60 sek. Studzienka 12: PYR – dodać 1 kroplę odczynnika PYR i odczytać po 10 min.
ODCZYT KOŃCOWY	Oprogramowanie Microgen

Uwaga: czarna obwódka wokół wierzchu studzienki wskazuje, że trzeba przed inkubacją dodać olej mineralny.

Zielona obwódka wokół wierzchu studzienki wskazuje, że trzeba dodać odczynniki po inkubacji.

PRZREZNACZENIE TESTU

System Microgen Staph ID zawiera 12 standaryzowanych substratów biochemicznych zestawionych w celu identyfikacji medycznie ważnych przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus*. Zestaw jest przeznaczony do diagnostyki in vitro jedynie w profesjonalnym laboratorium.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

W skład systemu Microgen Staph ID wchodzi pojedynczy pasek ze studzienkami zawierającymi 12 standardowych substratów biochemicznych wybranych na podstawie szerokiej analizy komputerowej opublikowanych baz danych do identyfikacji rodzaju *Staphylococcus*. Suche substraty w każdej studzience rozpuszcza się w zawieszynie badanego szczepu wykonanej w dostarczonym podłożu. Jeżeli badany szczep metabolizuje pojedyncze substraty, zachodzi zmiana barwy podczas inkubacji lub po dodaniu odpowiednich odczynników (zob. Tabela referencyjna substratów). Zmianę metabolizowanych substratów można interpretować używając do identyfikacji badanego szczepu oprogramowanie Microgen Identification System Software (MID-60).

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU

MID-69b bulion	Bulion do zawiesin STAPH-ID	20 bulionów po 3ml
MID-69C paski	Pasek ze studzienkami STAPH-ID	20 pasków

Pasek testowy Microgen zawiera 12 substratów biochemicznych do identyfikacji szczepów gronkowcowych – zobacz tabelę danych.

- 20 buteleczek z podłożem do przygotowania zawiesin.
- Podstawka do pasków.
- Formularze do wyników.
- Instrukcja użycia.

Dodatkowe wymagania:

1. Oprogramowanie Microgen Identification System Software (MID-60) – daje identyfikację opartą na prawdopodobieństwie, % prawdopodobieństwa i podobieństwie z analizą jakości różnicowania. Pełna definicja tych terminów znajduje się w podręczniku pomocy do oprogramowania. Oprogramowanie MID-60 (wersja 1.1.16.19 i poprzednie), które nie zawiera bazy danych dla *Staphylococcus* można uaktualnić włączając te dane do bazy poprzez wizytę na stronie internetowej Microgen Bioproducts www.microgenbioproducts.com.
2. Olej mineralny.
3. Odczynniki na azotany Nitrogen A + B.
4. Odczynnik PYR.
5. Microgen® Staph Latex.
6. Jałowe pipety i ezy.
7. Barwniki do metody Grama.
8. Woda utleniona.
9. Inkubator bez wentylatora (35 - 37°C).
10. Palnik Bunsena.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Bezpieczeństwo:

1. Odczynniki dostarczone w zestawie przeznaczone są jedynie do diagnostyki in vitro.
2. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności podczas pracy z organizmami potencjalnie patogennymi. Po użyciu należy zniszczyć cały zanieczyszczony materiał przez autoklawowanie, spalanie lub zalanie odpowiednim środkiem dezynfekcyjnym, np. podchlorynem sodowym w końcowym rozcieńczeniu 3% na 30 min. Ścieki płynne zawierające kwas muszą zostać zneutralizowane przed dalszą obróbką.
3. Powinno się uważać podczas używania dodatkowych odczynników, ponieważ mogą one zawierać substancje żrące lub drażniące. Szczegółowe informacje dostarczono razem z buteleczkami z poszczególnymi odczynnikami.

Procedura:

1. System Microgen Staph-ID powinien być używany zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawów.
2. Pasków ze studzienkami nie można inkubować w inkubatorze z CO₂.
3. Nieodpowiednia inkubacja, nieodpowiednie napełnienie studzienek lub nieodpowiednia gęstość inokulum mogą być przyczyną błędnych wyników.

PRZECHOWYWANIE I TERMIN WAŻNOŚCI

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

PRÓBKİ

Zawsze należy używać czystą 18 - 24 godz. hodowlę identyfikowanego szczepu bakteryjnego.

PROCEDURA – POSIEW I INKUBACJA

1. W celu potwierdzenia, że badany szczep należy do rodzaju *Staphylococcus*, wykonać preparat barwiony metodą Grama (Gram dodatnie ziarniaki w skupiskach), test na katalazę (katalazo-dodatnie) oraz test na aglutynację lateksową (Microgen®Staph Latex) lub test szkiełkowy na koagulazę (LAT). Zanotować wytwarzanie jakiegokolwiek barwnika przez kolonie (CPG).
2. Zawiesić pojedynczą kolonię z 18 - 24 godz. hodowli w podłożu dostarczonym z zestawem. Dokładnie wymieszać.
3. Delikatnie odkleić taśmę samoprzylepną z paska testowego ze studzienkami. **Nie wyrzucać taśmy, ponieważ będzie potrzebna później.**
4. Używając jałową pipetkę pasterowską dodać 3 - 4 krople (ok. 100 µl) zawiesiny bakteryjnej do każdej studzienki na pasku.
5. Jako sprawdzian czystości zawiesiny, nanieść 1 kroplę na płytkę z niewybiórczym podłożem różnicującym. Inkubować płytkę tlenowo w temp. 35 - 37°C przez 18 - 24 godz.
6. Po posianiu zalać studzienki 10. i 11. 3-4 kroplami oleju mineralnego. Studzienki te są otoczone czarną obwódką, aby ułatwić dodanie oleju do odpowiednich studzienek.
7. Zakleić wierzch paska taśmą samoprzylepną odklejoną wcześniej i inkubować w temp. 35 - 37°C. Odczytać wyniki po 18 - 24 godz. inkubacji.


PROCEDURA – ODCZYT I DODAWANIE ODCZYNNIKÓW

1. Usunąć taśmę samoprzylepną i zapisać wszystkie dodatnie reakcje przy pomocy kolorowej karty i tabelki z substratami (załączonych do tej ulotki). Zapisać wyniki w dostarczonym formularzu (1-11).
2. Dodać odpowiednie odczynniki do następujących studzienek:
 - a) Dodać 1 kroplę odczynnika PYR do studzienki 12. i odczytać wynik po 10 min. Pojawienie się bardzo głębokiego, różowo-czerwonego koloru, świadczy o wyniku dodatnim.
 - b) Wykonać test na redukcję azotanów w studzience 9. po odczytaniu i zapisaniu reakcji na β-Glukuronidazę. Dodać 1 kroplę odczynnika NIT A i 1 kroplę odczynnika NIT B do studzienki i odczytać po 60 sek. Pojawienie się czerwonego koloru wskazuje, że azotany zostały zredukowane do azotynów.
3. Zapisać te dodatkowe wyniki w dostarczonym formularzu (9a i 12).

IDENTYFIKACJA

W formularzu wynikowym Microgen Staph-ID substraty są pogrupowane w triplety (zestawy 3 reakcji), a każdemu substratowi przypisano wartość numeryczną (1, 2 lub 4). Suma dodatnich reakcji dla każdego tripletu tworzy pojedynczą cyfrę kodu ósemkowego, który używa się do oznaczenia szczepu. Kod ósemkowy wprowadza się do oprogramowania Microgen Identification System (MID-60), który generuje w wyniku 5 najbardziej prawdopodobnych organizmów w wybranej bazie danych. Oprogramowanie dostarcza identyfikację w oparciu o prawdopodobieństwo, % prawdopodobieństwa i podobieństwo, razem z analizą jakości różnicowania. Pełne definicje tych terminów i wyjaśnienie ich użyteczności w celu interpretacji dostarczono w podręczniku pomocy do oprogramowania.

Przykładowy formularz wyniku:

MICROGEN STAPHYLOCOCCUS-ID 12 TEST															
REPORT FORM															
Lab. No.	11239			Specimen Type:	Wound Swab										
Date:	13 th October 2005														
Staphylococcus ID															
Well Number	LAT	CPG	9a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction				SUC	TRE	MAN	NAG	MNS	TUR	PHO	BGL	BGN NIT	URE	ARG	PYR
24 hours	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1		2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	1			4			0			4			6		
Profile No:	14046			Final Identification: <i>Staph. epidermidis</i>											

Ważne:

Pasek ze studzienkami Microgen Staph-iD + testy zewnętrzne generują 5-członowy kod ósemkowy.

OGRANICZENIA TESTU

1. Wyniki powinny być interpretowane przez klinicystów na podstawie wszystkich dostępnych informacji klinicznych i laboratoryjnych.
2. System Microgen ID jest przeznaczony do identyfikacji drobnoustrojów zawartych w bazie danych. Nie powinien być używany do żadnych innych bakterii.
3. Sprawdzać tylko czyste, pojedyncze kolonie, ponieważ mieszane kolonie mogą dawać błędne wyniki.
4. Wyniki reakcji otrzymanych z użyciem Microgen Staph-ID mogą różnić się od opublikowanych danych otrzymanych dla substratów o innym składzie lub innych odczynników.
5. Pewne szczepy bakteryjne mogą mieć nietypowe reakcje biochemiczne i mogą sprawiać trudności w identyfikacji.
6. Wyniki identyfikacji generowane komputerowo powinny być interpretowane przez odpowiednio wyszkolony personel.
7. Kiedy oznacza się końcową identyfikację badanego szczepu, należy wziąć pod uwagę pochodzenie szczepu, barwienie metodą Grama, morfologię kolonii, testy dodatkowe i testy zaprzeczające sugerowanej identyfikacji.
8. Zabarwienie kolonii (CPG) oraz wyniki testu aglutynacji lateksowej (LAT) **lub** testu na koagulazę szkiełkową z plazmą króliczą należy zapisać dla wszystkich szczepów badanych przed posianiem paska ze studzienkami Microgen Staph-ID. Oprogramowanie Microgen Identification System wymaga podania 5-pozycyjnego kodu ósemkowego do interpretacji wyników.

KONTROLA JAKOŚCI

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

Staphylococcus aureus ATCC 12598

Staphylococcus epidermidis ATCC 14990

Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305

	L A T	C P G	N I T	S U C	T R E	M A N	N A G	M N S	T U R	P H O	β G L	β G N	U R E	A R G	P Y R
<i>S. aureus</i> NCTC 8530/ATCC 12598	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> NCTC 11047/ATCC 14990	-	-	+	+	-	-	-	-	v	+	-	-	+	+	-
<i>S. saprophyticus</i> NCTC 7292/ATCC 15305	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-

BAZA DANYCH

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

PORÓWNANIE TESTÓW

Microgen Staph-ID (MID-69) porównano ze standardowymi testami biochemicznymi innej dobrze znanej na rynku firmy. Przy pomocy obu testów zbadano 108 w pełni scharakteryzowanych szczepów *Staphylococcus*.

	Total Tested	MID-69	Competitor
<i>S. aureus</i>	45	45	45
<i>S. epidermidis</i>	19	19	19
<i>S. haemolyticus</i>	12	11	12
<i>S. simulans</i>	8	8	8
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	3	3	3
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticum</i>	2	2	2
<i>S. warneri</i>	5	5	5
<i>S. saprophyticus</i>	2	2	2
<i>S. ludergensis</i>	2	2	2
<i>S. chromogenes</i>	2	2	2
<i>S. hominis</i>	3	3	3
<i>S. cobni</i> subsp. <i>Cobni</i>	1	1	1
<i>S. lentus</i>	1	1	1
<i>S. xylosum</i>	1	1	0
<i>S. caprae</i>	1	1	1
<i>S. auricularis</i>	1	1	1
Total	108	107	107

ODTWARZALNOŚĆ

Wewnątrz serii: przebadano hodowle bakteryjne z użyciem pasków ze studzienkami pochodzących z trzech serii Microgen Staph-ID. Każdą partię produktu używano trzy razy zmieniając osobę wykonującą test. Wyniki otrzymane przez trzy osoby zgadzały się ze sobą, dając odtwarzalność wewnątrz serii powyżej 99%.

Między seriami: użyto paski z trzech serii Microgen Staph-ID dla 5 hodowli bakteryjnych. Odtwarzalność między seriami wynosiła powyżej 99%.

LITERATURA

1. Lapage S.P, Bascombe S, Willcox W.R and Curtis M.A. (1973) Identification of Bacteria by Computer: General Aspects and Perspectives J.Gen. Microbiol. 77:273-290
2. Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition.
3. Murray P.R. (Ed) (1999) Manual of Clinical Microbiology 7th Edition. American Society for Microbiology, Washington, DC
4. Murray P.R. (Ed) (2003) Manual of Clinical Microbiology 7th Edition. American Society for Microbiology, Washington, DC

TABELA SUBSTRATÓW

Studzienka	Reakcja	Opis	Dodatni	Ujemny
1	Sacharoza	Fermentacja – czerwień fenolowa zmienia się z czerwonej na żółtą w wyniku wytwarzania kwasu podczas fermentacji węglowodanów.	żółty/ żółtopoma- rańczowy	czerwony
2	Trehaloza			
3	Mannitol			
4	N-acetylo- glukozamina			
5	Mannoza			
6	Turanoza			
7	Alkaliczna fosfataza	Hydroliza fosforanu p-nitrofenylu przez alkaliczną fosfatazę powoduje wytwarzanie żółtego p-nitrofenolu.	żółty	bezbarwny
8	Glukozydaza	Hydroliza p-nitrofenylu β D glukopiranozydu przez glikozydazę powoduje wytwarzanie żółtego o-nitrofenolu.	żółty	bezbarwny
9	Glukuronidaza	Hydroliza o-nitrofenylu β D glukuronidu przez glukuronidazę powoduje wytwarzanie żółtego p-nitrofenolu.	żółty	bezbarwny
9	Azotany	Azotany redukowane są do azotynów, które tworzą ciemnoczerwony kompleks po dodaniu α-naftylaminy i kwasu sulfanilowego.	czerwony	żółty
10	Ureaza	Hydroliza mocznika powoduje wytwarzanie amoniaku, prowadząc do wzrostu pH, co powoduje zmianę koloru czerwieni fenolowej z żółtego do różowego/czerwonego.	bardzo ciemno- różowy	słomkowy do jasnorożowego
11	Arginina	Arginina jest przekształcana w ornitynę, amoniak i CO ₂ przez dihydrolazę argininy, dając wzrost pH i zmianę barwy błękitu bromotymolowego z zielonej na niebieską. Po 48 godz. reakcje zielone są ujemne.	zielononiebieski /niebieski	żółty żółtozielony
12	PYR	Hydroliza L-pirrolidonylo-α-naftylamidu przez enzym arylamidazę pirrolidonylową.	czerwony/ ciemnoró-żowy	bezbarwny/ bardzo jasnoróżowy
	LAT	Test aglutynacji lateksowej na koagulazę i białko A, albo koagulaza szkiełkowa lub probówkowa.		
	CPG	Pojawienie się widocznej pigmentacji kolonii (barwy kremowej do złocistej).		

Szczepy identyfikowane z zastosowaniem testu:

***Staphylococcus* spp.**

S. aureus subsp. *aureus*
S. aureus subsp. *anaerobius*
S. auricularis
S. caprae
S. capitis subsp. *capitis*
S. capitis subsp. *urealyticus*
S. carnosus
S. chromogenes
S. cohnii subsp. *cohnii*
S. cohnii subsp. *urealyticum*
S. epidermidis
S. haemolyticus
S. hominis subsp. *hominis*
S. hominis subsp. *novobiosepticus*
S. hyicus
S. intermedius
S. lentus
S. lugdenensis
S. saccharolyticus
S. saprophyticus
S. schleiferi subsp. *schleiferi*
S. schleiferi subsp. *coagulans*
S. sciuri
S. simulans
S. warneri
S. xylosus

***Kocuria* spp.**

K. kristinae
K. rosea
K. carniphila

***Kytococcus* spp.**

Ky. sedentarius

***Micrococcus* spp.**


M. luteus
M. lylae


Tabela reakcji


	LAT	CPG	NIT	SUC	TRE	MAN	NAG	MNS	TUR	PHO	BGL	BGN	URE	ARG	PYR
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	99.9	85	85	98	97	98	90	93	95	99.9	99.9	0.1	82	90	0.1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	0.1	0.1	0.1	99.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	99	0.1	0.1	0.1	60	0.1
<i>S. auricularis</i>	0.1	0.1	75	50	99.9	5	0.1	45	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	90	99.9
<i>S. caprae</i>	0.1	0.1	99.9	0.1	87	25	5	80	0.1	99.9	0.1	0.1	65	99.9	50
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	0.1	0.1	80	45	0.1	50	0.1	75	0.1	20	0.1	0.1	30	80	0.1
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	0.1	30	99.9	99.9	0.1	90	0.1	96	0.1	0.1	0.1	0.1	95	80	0.1
<i>S. carnosus</i>	0.1	0.1	99.9	0.1	90	99.9	90	99.9	0.1	85	0.1	0.1	0.1	99.9	99.9
<i>S. chromogenes</i>	0.1	75	99.9	99.9	99.9	23	35	90	50	96	40	0.1	95	89	65
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	0.1	0.1	20	50	93	89	0.1	60	0.1	98	0.1	0.1	0.1	2	0.1
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	0.1	68	0.1	0.1	99.9	96	90	95	0.1	95	0.1	99.9	94	0.1	0.1
<i>S. epidermidis</i>	0.1	0.1	90	97	0.1	0.1	0.12	70	50	82	50	0.1	85	73	0.1
<i>S. haemolyticus</i>	0.1	45	82	99.9	95	66	85	7	50	4	78	0.1	4	85	50
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	0.1	55	80	95	85	25	45	2	99.9	24	0.1	0.1	85	40	0.1
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	0.1	0.1	90	99	0.1	0.1	0.1	30	99.9	0.1	10	0.1	99	0.1	0.1
<i>S. hyicus</i>	50	0.1	90	89	90	7	92	90	0.1	93	50	99.9	66	99.9	0.1
<i>S. intermedius</i>	50	0.1	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	75	4	99.9	50	0.1	50	80	0.1
<i>S. lentus</i>	0.1	0.1	99.9	99.9	99.9	99.9	90	92	99.9	20.1	99.9	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>S. lugdenensis</i>	0.1	75	95	99.9	95	0.1	99.9	85	50	5	99.9	0.1	50	0.1	99.9
<i>S. saccharolyticus</i>	0.1	0.1	95	0.1	60	0.1	0.1	10	70	0.1	0.1	0.1	0.1	95	0.1
<i>S. saprophyticus</i>	0.1	80	25	99.9	95	89	70	0.1	99.9	0.1	50	0.1	84	30	0.1
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	90	0.1	99.9	0.1	70	0.1	99.9	99.9	0.1	95	0.1	0.1	0.1	99.9	0.1
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	0.1	0.1	99.9	24	0.1	48	80	99.9	49	99	0.1	0.1	99.9	99.9	20
<i>S. sciuri</i>	0.1	49	99.9	99.9	99.9	99.9	83	99.9	60	98	99.9	0.1	0.1	0.1	99.9
<i>S. simulans</i>	0.1	0.1	90	95	95	85	90	50	0.1	25	5	90	85	95	99.9
<i>S. warneri</i>	0.1	62	30	99.9	94	80	8	50	50	0.12	99.9	60	92	72	0.1
<i>S. xylosus</i>	0.1	47	80	90	95	90	85	90	50	65	99.9	99.9	85	5	99.9
<i>K. kristinae</i>	0.1	19	10	99.9	98	5	0.1	99.9	0.1	0.1	99.9	0.1	15	0.1	95
<i>K. rosea</i>	0.1	0.1	90	12	0.1	10	0.1	8	0.1	0.1	99.9	35	0.1	0.1	0.1
<i>K. camiphila</i>	0.1	85	83	15	10	0.1	0.1	10	0.1	0.1	0.1	0.1	85	0.1	15
<i>Ky. sedentarius</i>	0.1	24	5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	70	0.1
<i>M. luteus</i>	0.1	80	4	15	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	32	0.1	85
<i>M. lyiae</i>	0.1	0.1	10	5	0.1	0.1	7	5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	50

Tabela wyników

Odczyt po 24h inkubacji

WELL/NAPFCHEN /GODET	1 to 6	7	8	9	9a	10	11	12
Reaction	Carbohydrate Fermentation	PHS	β CL	β GN	(β GN) Nitrate	Urease	Arginine	PYR
Negative								 
Positive	 	 	 	 	 	 	 	 

 Należy dodać odpowiednie odczynniki po 18-24h hodowli.

 Studzienki należy pokryć parafiną.



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