

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

GN 24 je standardizovaný identifikační systém pro běžnou druhovou identifikaci Gram negativních tyček, který využívá 24 miniaturizovaných biochemických testů a internetové databáze. Na konci návodu je uveden kompletní seznam všech mikroorganismů, pro které je souprava určena.

PRINCIP

Souprava GN 24 sestává z 24 jamek trojstripu mikrotitrační destičky v klasickém 96 jamkovém formátu obsahujících dehydratované substráty, přičemž GN 24 sp je ve formě trojstripů dělené - stripovatelné mikrotitrační destičky a GN 24 fp je ve formě nedělené - celé mikrotitrační destičky. Rekonstituce substrátů probíhá inokulací bakteriální suspenze. V průběhu inkubace dochází v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů k barevným změnám v jednotlivých jamkách. Odečet výsledků testů probíhá vizuálně na základě barevné stupnice nebo barevného vyjádření popsaného v pracovním návodu. Výsledky identifikace se odečtou z vyhodnocovací tabulky nebo za pomoci vyhodnocovacího softwaru, který najdete na www.diagnostics.sk/idmicro.

OBSAH SOUPRAVY - 40 testů (sp) / 100 testů (fp)

- 10 / 25 mikrotitračních destiček GN 24
- 40 / 100 výsledkových formulářů
- 10 / 25 inkubačních sáčků
- 1 příbalový leták

POTŘEBNÁ, ALE NEDODÁVANÁ ČINIDLA A MATERIÁL

Činidla:

- NaCl 0.85 % 3,5 - 5 ml
- Parafinový olej (Ref. 3001)
- PHS reagent (Ref. 3008)
- IND reagent (Ref. 3002)
- NIT reagent (Ref. 3005)
- VP a VP reagent (Ref. 2004 a 3004)
- Zn (Ref. 5001)
- OXI (Ref. 2001)
- PYR a PYR reagent (Ref. 2003 a 3003)
- Identifikační software (na stránkách společnosti)

Materiál:

- Pipety
- Tampony, kličky, kahan, zkumavky a další základní vybavení mikrobiologické laboratoře

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro* a k mikrobiologické kontrole
- Pouze pro profesionální použití.
- Dodržujte přesně pracovní návod!
- Veškeré vzorky a inokulované produkty se musí považovat za potencionálně infekční a je třeba respektovat při manipulaci s nimi obvyklá bezpečnostní opatření dle předpisů platných v každé zemi.
- Nepoužívejte produkt po datu expirace.
- Před použitím zkontrolujte, zda je obal nepoškozen. Poškozené soupravy nepoužívejte.

Při interpretaci výsledků je nutno vzít v úvahu anamnézu pacienta, zdroj vzorku, morfologii kolonie, mikroskopickou morfologii kmene, a pokud je to nezbytné, výsledky všech dalších provedených testů, zejména výsledků antibiogramu.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

Diagnostické soupravy se dodávají ve vícevrstvých sáčcích na bázi hliníku a organických polymerů. Součástí každého sáčku je dodatečně silikagelové sušidlo. Uchovávejte soupravy při teplotě +2 až +25°C. Exspirace je uvedena na každém balení.

Po otevření uložte nepoužitý zbytek mikrotitrační destičky do přiloženého hliníkového sáčku vč. originálního silikagelového sušidla, sáček pečlivě uzavřete a uložte do chladničky. Takto lze skladovat produkt po dobu 2 týdnů (nebo do data expirace v případě, že nastane dříve).

VZORKY

Mikroorganismy, které mají být identifikovány izolujte z vhodného neselektivního kultivačního média (např. krevní agar, trypton – soya agar apod.) podle standardních mikrobiologických technik.

Z čisté kultury proveďte Gramovo barvení a mikroskopii. Proveďte test průkazu cytochromoxidázy – OXI (případně katalázový test – CAT). Konfirmované izobáty identifikujte na soupravě GN 24.

PRACOVNÍ POSTUP

Příprava inokula

- Otevřete zkumavku fyziologického roztoku nebo použijte jakýkoliv sterilní 0,85% roztok chloridu sodného.
- Bakteriologickou kličkou nebo tamponem naberte z čisté a dobře narostlé 18 - 48 hod. kultury několik dobře izolovaných kolonií.
- Zákal řádně homogenizované suspenze musí odpovídat hustotě zákalu 2 McF.
Tato suspenze se musí použít ihned po přípravě.

TIP: V případě potřeby proveďte ověření čistoty inokula křížovým roztěrem stejnou kličkou nebo tamponem, kterým jste připravovali suspenzi.

Takto připravená Petriho miska může sloužit k provedení doplňkových testů následující den!

Příprava mikrotitrační destičky

- Připravte si mikrotitrační destičku
- Zaznamenejte na ni čísla vyšetřovaných kultur

TIP: V případě prvního použití soupravy GN 24 sp vyjměte nepotřebné stripy a vložte do hliníkového sáčku se sušidlem a pečlivě uzavřete. Pro další použití si ponechte rámeček mikrotitrační destičky.

Inokulace

- Inokulujte 0,1 ml řádně homogenizované suspenze do každé jamky monstripu.
- Testy URE až LYS (jamky H až C) překryjte 2 - 3 kapkami parafinového oleje. Test GLU (jamka G) překryjte čtyřmi kapkami parafinového oleje.

Inkubace

- Vložte mikrotitrační destičku do přiloženého PE sáčku, jehož konec zahněte pod destičku – zabráníte tím vysychání bakteriální suspenze.
- Inkubujte při běžné atmosféře a teplotě 35 ± 2 °C po dobu 18 - 24 hodin.

TIP: pro optimální průběh inkubace zajistěte v inkubátoru vyšší vlhkost vložením např. kádinky s čistou vodou nebo provádějte inkubaci při řízené úrovni vlhkosti.

Při podezření na přítomnost nefermentujících tyček odečtete test GLU po 4 hodinách. Test GLU může při některých metabolicky aktivnějších nefermentujících tyček vykazovat pozitivitu po 24 hodinové inkubaci. Do identifikačního programu zaznamenejte výsledek získaný po 4 hodinách inkubace.

V případě **neprůkazného** vybarvení testů v jamkách odpovídajícím cukrům - prodlužte inkubaci u nefermentujících tyček (test GLU je po 4 – 24 hodinách negativní!) na 48 hodin.

HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Po době inkubace vyhodnoťte testy za pomoci odečítací tabulky, barevné stupnice nebo výsledků kontrolních kmenů.

Testy NAG / IND, GLR / ESL, bGL / PHE, GGT / PHS a bGA / NIT jsou bifunkční a po odečtení primární reakce lze získat zakapáním příslušnými činidly druhý výsledek z již odečtené jamky mikrotitrační destičky.

V případě potřeby proveďte následující bifunkční testy:

Jamka H2: NAG / IND – přikápněte 2 – 3 kapky IND – reagentu a počkejte 1 – 2 minuty na vybarvení testu.

Jamka H3: GLR / ESL – odečtete pozitivní test GLR pro *E. coli*

Jamka A1: bGL / PHE – přikápněte 1 kapku činidla PHE nebo IND (pro průkaz TDA) a vyhodnoťte.

Jamka A3: bGA / NIT – přikápněte 2 kapky NIT – reagentu a vyhodnoťte.

Pro nefermentující tyčky proveďte navíc následující bifunkční test:

Jamka A2: GGT / PHS – přikápněte 1 – 2 kapky PHS – reagentu a vyhodnoťte

- Zapište výsledek bifunkčního testu do formuláře pro odečet výsledků nebo do vyhodnocovacího software

IDENTIFIKACE

Výsledek identifikace se získá pomocí:

- identifikační tabulky
- identifikačního softwaru

Identifikace pomocí identifikační tabulky:

Srovnajte výsledky testů a proveďte vyhodnocení dle výsledků testů uvedených v tomto návodu na straně 4.

Identifikace pomocí identifikačního software:

Zadejte výsledky jednotlivých testů.

V případě, že nelze některý z testů hodnotit je možné ho v programu vynechat. Software umožňuje vkládání dodatkových testů a tím i zvýšení identifikační účinnosti. Software microID je pro zákazníky volně k dispozici na stránkách společnosti.

KONTROLA KVALITY

Kvalita vyráběných diagnostických souprav se systematicky kontroluje. Chemikálie jsou nakupovány pouze od certifikovaných firem a kvalita těchto chemikálií je ověřena doloženým analytickým certifikátem. Funkčnost souprav jsou mimo jiné testována na kontrolních sbírkových kmech, kontrolována a testována je také přítomnost bakteriální kontaminace. Soupravy jsou podrobovány zátěžovým testům při zvýšené teplotě a z každé šarže jsou ukládány referenční vzorky pro správné posouzení případných pozdějších reklamací.

PRO POTŘEBU VLASTNÍHO OVĚŘENÍ FUNKČNOSTI SOUPRAVY DOPORUČUJEME POUŽÍT NÁSLEDUJÍCÍ KONTROLNÍ KMENY:

Kontrolní kmen <i>Escherichia coli</i>	CCM / ATCC 4225 / 35218	URE	GLU	H2S	ARG	ORN	LYS	SCI	bGL	PHE
		-	+	-	+/-	+	+		-	-
IND	NAG	SUC	TRE	MAN	LAC	CEL	MAL	GGT	PHS	
+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	
GLR	ESL	DUL	ADO	SOR	RHA	RAF	INO	bGA	NIT	
+	-	+/-	-	+	+	-	-	+	+	

Kontrolní kmen <i>Proteus sp.</i>	CCM / ATCC 1799 / -	URE	GLU	H2S	ARG	ORN	LYS	SCI	bGL	PHE
		+	+	+	-	-	-	-	-	-
IND	NAG	SUC	TRE	MAN	LAC	CEL	MAL	GGT	PHS	
+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
GLR	ESL	DUL	ADO	SOR	RHA	RAF	INO	bGA	NIT	
-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	

Kontrolní kmen <i>K. pneumoniae</i>	CCM / ATCC 5852 / 13882	URE	GLU	H2S	ARG	ORN	LYS	SCI	bGL	PHE
		+	+	-	-	-	+	+	+	+
IND	NAG	SUC	TRE	MAN	LAC	CEL	MAL	GGT	PHS	
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GLR	ESL	DUL	ADO	SOR	RHA	RAF	INO	bGA	NIT	
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Kontrolní kmen <i>P. aeruginosa</i>	CCM / ATCC 3955 / 27853	URE	GLU	H2S	ARG	ORN	LYS	SCI	bGL	PHE
		+	-	-	+	-	-	+	-	-
IND	NAG	SUC	TRE	MAN	LAC	CEL	MAL	GGT	PHS	
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
GLR	ESL	DUL	ADO	SOR	RHA	RAF	INO	bGA	NIT	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

CCM: Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno, Kamenice 5, 625 00 Brno, tel. +420549491430, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Profily získané po 24 hodinách inkubace po kultivaci na krevním nebo trypton soyovém agaru. Kontrolní kmeny slouží pouze k ověření funkčnosti jednotlivých testů, nikoliv pro kontrolu správnosti identifikace.

OMEZENÍ METODY A NEJČASTĚJŠÍ PŘÍČINY NEÚSPĚCHU IDENTIFIKACE

- Diagnostická GN 24 je určena pouze k identifikaci bakterií uvedených v tomto návodu.
- Lze použít pouze čistou kulturu vyšetřovaného mikroorganismu.
- Testy nebyly převrstveny parafinovým olejem.
- Kontaminace jamek inokulem z dalšího stripu.
- Jedná se o atypický kmen.
- Nedodržení některého bodu pracovního návodu.

CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

Bylo testováno 150 sbírkových kmenů a kmenů klinického původu, ale i veterinárních kmenů patřících k druhům zahrnutým v databázi:

GLU fermentující tyčky:

- 92/88 % kmenů bylo správně identifikováno (s doplňkovými testy).
- 89/87 % kmenů bylo správně identifikováno bez dodatkových testů

GLU nefermentující tyčky:

- 96/87 % kmenů bylo správně identifikováno (s doplňkovými testy).
 - 81/74 % kmenů bylo správně identifikováno bez dodatkových testů
- Pozn. údaj před / za lomítkem zodpovídá rodové / druhové identifikaci.

LIKVIDACE ODPADU

S materiálem zacházejte jako s potenciálně infekčním agens. Odpad likvidujte dle interních operačních postupů a směrnic v souladu s legislativou své země.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

JAMKA - 1. řádek	ZKRATKA TESTU	NÁZEV TESTU	VÝSLEDEK TESTU	
			NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ
H	URE	Urea	žlutá / oranžová	červená / růžová
G	GLU	Glukóza	zelená	žlutá / žlutozelená
F	H ₂ S	Sirovodík	zákal suspenze	černá / šedočerná
E	ARG	Arginin	zelená	modrá
D	ORN	Ornitin	žlutá / zelená	modrá
C	LYS	Lyzin	žlutá / zelená	modrá
B	SCI	Simmons citrát	žlutá / zelená	modrá
A	bGL	b-glukosidáza	bezbarvá	žlutá
A'	PHE	Fenylalanin	žlutá / zákal suspenze	tmavě zelená / zelená
JAMKA - 2. řádek	ZKRATKA TESTU	NÁZEV TESTU	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ
H'	IND	Indol	žlutá / růžová	červená / červenooranžová
H	NAG	N – acetyl-glukosaminid	zákal suspenze	žlutá
G	SUC	Sacharóza	zelená	žlutá / žlutozelená
F	TRE	Trehalóza	zelená	žlutá / žlutozelená
E	MAN	Manitol	zelená	žlutá / žlutozelená
D	LAC	Laktóza	zelená	žlutá / žlutozelená
C	CEL	Celobióza	zelená	žlutá / žlutozelená
B	MAL	Malonát	žlutá / zelená	modrá
A	GGT	Gamma glutamyl transferáza	zákal suspenze	žlutá
A'	PHS	Alkalická fosfatáza	žlutá / zákal suspenze	růžová
JAMKA - 3. řádek	ZKRATKA TESTU	NÁZEV TESTU	NEGATIVNÍ	POZITIVNÍ
H'	GLR	b-glukuronidáza	zákal suspenze	žlutá
H	ESL	Eskulín	běžová / bledě hnědá	tmavě hnědá
G	DUL	Dulcitol	zelená	žlutá / žlutozelená
F	ADO	Adonitol	zelená	žlutá / žlutozelená
E	SOR	Sorbitol	zelená	žlutá / žlutozelená
D	RHA	Ramnóza	zelená	žlutá / žlutozelená
C	RAF	Rafinóza	zelená	žlutá / žlutozelená
B	INO	Inozitol	zelená	žlutá / žlutozelená
A	bGA	b-galaktosidáza	zákal suspenze	žlutá
A'	NIT	Nitráty	zákal suspenze / žlutá	tmavě růžová

