

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Diagnostická souprava ENC 8 je standardizovaný identifikační systém pro běžnou druhovou identifikaci klinicky významných zástupců rodu *Enterococcus*, který využívá 9 miniaturizovaných biochemických testů a internetové databáze. Na konci návodu je uveden kompletní seznam všech mikroorganismů, pro které je souprava určena.

PRINCIP

Souprava ENC 8 sestává z 8 jamek mono stripu mikrotitrační destičky v klasickém 96 jamkovém formátu obsahujících dehydratované substráty. Rekonstituce substrátů probíhá inokulací bakteriální suspenzí. V průběhu inkubace dochází v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů k barevným změnám v jednotlivých jamkách. Odečet výsledků testů probíhá vizuálně na základě barevné stupnice. Výsledky identifikace se odečtou z vyhodnocovací tabulky s přehledem profilů nebo za pomoci vyhodnocovacího softwaru.

OBSAH SOUPRAVY - 60 testů

- 5 mikrotitračních deštiček ENC 8
- 60 výsledkových formulářů
- 5 inkubačních sáčků
- 1 příbalový leták

POTŘEBNÁ, ALE NEDODÁVANÁ ČINIDLA A MATERIÁL

Činidla:

- Parafinový olej (Ref. 3001)
- PYR (Ref. 2003)
- PYR reagent (Ref.3003) pro průkaz pyrrolidonylarylamidázy
- PHS reagent (Ref. 3008)

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 potenciálně 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 a mikroskopickou morfologii kmene a, pokud je to nezbytné, výsledky všech dalších provedených testů, obzvláště výsledky antibiogramu.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

Diagnostické soupravy se dodávají ve vícevrstvých sáčcích na bázi hliníku, polyamidu a PE. Součástí každého sáčku je silikagelové sušidlo. Uchovávejte soupravy při teplotě **+2 až +25°C**. Expirace je uvedena na každém balení.

Po otevření uložte nepoužitý zbytek mikrotitrační destičky do 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 (krevní agar) podle standardních mikrobiologických technik.

Potvrďte příslušnost k rodu *Enterococcus* aglutinačně, selektivními půdami nebo pomocí PYR. Konfirmované izobáty identifikujte na ENC 8. Posuďte čistotu a morfologii bakteriální kultury. Zhodnoťte hemolytickou aktivitu, motilitu a tvorbu žlutého pigmentu.

PRACOVNÍ POSTUP

Příprava inokula

- Použijte jakýkoliv sterilní nepufrovaný vytemperovaný fyziologický roztok.
- Bakteriologickou kličkou nebo tamponem naberte z čisté 18 – 24 hod. kultury několik dobře izolovaných kolonií.
- Zákal řádně homogenizované suspenze musí odpovídat 2 – 3 McF. Tato suspenze se musí použít ihned po přípravě.

Inokulace

- Zaznamenejte na stripu čísla vyšetřovaných kultur
- Inokulujte 0,1 ml řádně homogenizované suspenze do každé jamky monstripu.
- Test ARG (jamka H) překryjte 2 – 3 kapkami parafinového oleje.

Inkubace

- Vložte rámeček s inokulovanými stripy do přiloženého PE sáčku, jehož konec zahněte pod destičku – zabráníte tím vysychání bakteriální suspenze.
- Inkubujte aerobně při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 18 až 24 hodin.

HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Po době inkubace testovací strip odečtěte za pomoci odečítací tabulky, barevné stupnice nebo výsledků kontrolních kmenů.

Test GLR / PHS - je bifunkční, po odečítání GLR, můžeme získat další výsledek z tytéž jamky.

Jamka A: GLR / PHS - přidejte jednu kapku PHS reagentu a vyhodnoťte

IDENTIFIKACE

Výsledek identifikace se získá pomocí:

- identifikační tabulky
- oktalového kódu

Identifikace pomocí identifikační tabulky:

Srovnajte výsledky testů a proveďte vyhodnocení dle výsledků testů uvedených v tomto návodu na straně 2.

Identifikace pomocí oktalového kódu:

Rozdělte testy do za sebou jdoucích trojic a přiřadte pozitivním testům v trojici následující hodnoty: První test = 1, druhý test = 2, třetí test = 4. Součtem hodnot pro každou trojici vznikne trojmístný oktalový kód, který můžete vyhledat v identifikační tabulce a identifikujete tak výsledek stanovení.

KONTROLA KVALITY

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

OMEZENÍ METODY A PŘÍČINY NEÚSPĚCHU IDENTIFIKACE

- Nedodržení některého bodu pracovního návodu
- Kontaminace jamek inokulem z dalšího stripu
- Jedná se o atypický kmen

CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

- Rod *Enterococcus*

Bylo testováno celkem 105 sbírkových kmenů a bakteriálních kmenů klinického původu patřících k druhům zahrnutým v databázi:

Interní testování:

- 98 % kmenů bylo správně identifikováno (s doplňkovými testy nebo bez nich).
- 2 % kmenů nebylo identifikováno.
- 0 % bylo identifikováno špatně.

Nezávislé testování:

- 97 % kmenů bylo správně identifikováno (s doplňkovými testy nebo bez nich).
- 3 % kmenů nebylo identifikováno.
- 0 % bylo identifikováno špatně.

LIKVIDACE ODPADU

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

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

Kontrolní kmen	CCM	ATCC	ARG	SOE	MAN	ARA	SOR	RAF	MLZ	GLR	PHS
<i>Enterococcus faecalis</i>	4224	29212	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Enterococcus raffinosus</i>	4216	49427	-	+	+	+	+	+	+	-	v
<i>Enterococcus cecorum</i>	3659	43198	-	-	v	-	v	+	v	+	+

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 18 až 24 hodinách inkubace po kultivaci na krevním agaru. Kontrolní kmeny slouží pouze k ověření funkčnosti jednotlivých testů, nikoliv pro kontrolu správnosti identifikace.

ODEČTACÍ TABULKA

JAMKA	ZKRATKA TESTU	NÁZEV TESTU	VÝSLEDKY	
			POZITIVNÍ	NEGATIVNÍ
H	ARG	Arginin	Červenofialová / červená	Žlutá, žlutooranžová
G	SOE	Sorbóza	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
F	MAN	Manitol	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
E	ARA	Arabinóza	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
D	SOR	Sorbitol	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
C	RAF	Rafinóza	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
B	MLZ	Melezitóza	Žlutá / světle oranžová	Červená/ oranžovočervená
A	GLR	b - glukuronidáza	Žlutá	Bezbarvá / zákal suspenze
0	PHS	Alkalická fosfatáza	Světle růžová	Bezbarvá / zákal suspenze

Identifikační tabulka a seznam profilů:

název	ARG	SOE	MAN	ARA	SOR	RAF	MLZ	GLR	PHS	YEP*	MOT**	Profil
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	-	520,521,524
<i>Enterococcus faecium</i>	+	-	+	+	(-)	-	-	-	-	-	-	510
<i>Enterococcus mundtii</i>	+	-	+	+	+	v	-	-	-	+	-	530, 537
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	550 (YEP +)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	550 (YEP-)
<i>Enterococcus durans / Enterococcus hirae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
<i>Enterococcus dispar / Enterococcus hirae</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	104
<i>Enterococcus malodoratus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	660
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	620
<i>Enterococcus sacharolyticus</i>	-	(-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-	461,661
<i>Enterococcus raffinosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	671
<i>Enterococcus avium</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	631
<i>Enterococcus cecorum</i>	-	-	(-)	-	v	+	v	+	+	-	-	xx6, xx7
<i>Enterococcus columbae</i>	-	-	+	(+)	(+)	+	(-)	-	+	-	-	474

Vysvětlivky: + = 90 – 99 %; (+) = 66 – 89 %; v = 34 – 65 %; (-) = 11 – 33 %; - = 1 – 10 %

*YEP – tvorba žlutého pigmentu, **MOT – motilita

Literatura:

1. FACKLAM, R. R., SAHM, D. F. *Enterococcus*. Manual of Clinical Microbiology, 6.vydání. American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 1995. s. 308 – 314.
2. MANERO, A., BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology. 1999. s. 4425 – 4430.
3. Devriese L A, Collins M D, Wirth R. The genus *Enterococcus*. In: Ballows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H, editors; Ballows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H, editors. The prokaryotes. New York, N.Y.: Springer-Verlag; 1991. pp. 1465–1477.
4. Devriese L A, Pot B, Collins M D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J Appl Bacteriol. 1993;**75**:399–408.
5. Facklam R R. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. Appl Microbiol. 1972;**23**:1131–1139.
6. Facklam R R, Collins M D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol. 1989;**27**:731–734
7. Fertyly S S, Facklam R. Comparison of physiologic tests used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci, and streptococci. J Clin Microbiol. 1987;**25**:1845–1850
8. MacFaddin J F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore, Md: Williams and Wilkins Co.; 1980
9. Schleifer K H, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1984;**34**:31–34.
10. Mabel S. Y., Facklam, R., R.: New Test System for Identification of Aerococcus, Enterococcus, and Streptococcus Species. J. Clin. Microbiol., Oct. 1986, P. 607-611
11. Motlová, J.: Kam spěje taxonomie rodů *Streptococcus* a *Enterococcus*? I.část. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2003; (7):298-305.
12. Motlová, J.: Kam spěje taxonomie rodů *Streptococcus* a *Enterococcus*? II.část. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2003; 12(8):339-342.