

SYSTEM DE IDENTIFICARE PENTRU MICROORGANISME GRAM NEGATIVE

MICROBACT™ 12A (12E) AND 24E (12A (12E) + 12B)

CODES: MB1073, MB1074, MB1076, MB1077, MB1130, MB1131, MB1132, MB1133.

Destinația de utilizare

Sistemul Microbact™ Gram-negativ trebuie să fie utilizat pentru identificarea de bacterii aerobe și facultativ anaerobe Gram-negative (Enterobacteriaceae și diverse bacterii Gram-negative)

Principiul de testare

Sistemul Microbact™ Gram-negativ este o formă standardizată micro-substrat sistem proiectat pentru a simula reacțiile biochimice convenționale utilizate pentru identificarea de Enterobacteriaceae și diversi bacili Gram-negativi (MGNB).

Produsul Microbact™ Gram-negative constă în două benzi separate substrat, 12A și 12B. Fiecare bandă este formată din 12 substraturi biochimice diferite. Banda de 12A poate fi utilizat numai pentru identificarea de-oxidazo negative, nitrat de glucoză-pozitiv fermentoare care cuprinde 15 genuri și pot fi utile pentru screeningul enterobacteriilor patogene din specimene enterice și urină sau de identificare ale altor izolate comune. Banda de 12B poate fi utilizat împreună cu banda 12A pentru identificarea de oxidazo-pozitive, nitrat-negativ, și glucoză-nonfermentative (MGNB), precum și Enterobacteriaceae.

Cu ajutorul 12 A putem identifica specii oxidazo-negative, Gram "-":

Enterobacteriaceae

Acinetobacter spp.	Shigella spp.	<i>P. stuartii</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Shigella serogp. AB&C</i>	<i>P. alcalifaciens</i>
<i>A. lwoffii</i>	<i>S. sonnei</i>	Salmonella spp.
<i>A. haemolyticus</i>	Hafnia sp.	<i>Salmonella spp.</i>
Citrobacter spp.	<i>H. alvei</i>	<i>S. typhi</i>
<i>C. freundii</i>	Klebsiella spp.	<i>S. cholerae-suis</i>
<i>C. diversus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. paratyphi A</i>
Enterobacter spp.	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. arizonae</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>K. ozaenae</i>	Serratia spp.
<i>E. cloacae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>E. agglomerans</i>	Morganella sp.	<i>S. liquefaciens</i>
<i>E. gergoviae</i>	<i>M. morganii</i>	<i>S. rubidaea</i>
<i>E. sakazakii</i>	Proteus spp.	Tatumella sp.
Escherichia spp.	<i>P. mirabilis</i>	<i>T. tyseos</i>
<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	Yersinia spp.
<i>E. coli-inactive</i>	Providencia spp.	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>E. vulneris</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>

Precautii:

1. Aceste stripuri sunt destinate pentru diagnosticul numai *in vitro*, pentru a fi utilizate de către personalul de laborator calificat folosind tehnici aseptice și măsurile de precauție stabilit împotriva riscurilor microbiologice.
2. Materialele folosite trebuie să fie autoclavate, incinerate, sau scufundate în bactericid înainte de eliminare.
3. NU se incubează într-un incubator de CO₂, substraturi și / sau reacții enzimatică ar putea fi afectate în mod negativ, inducând reacții false.

Instrucțiuni de păstrare :

Stripurile sunt stabile dacă sunt păstrate în plicuri sigilate până la data expirării la 2-8 ° C. Odată ce pachetul a fost deschis, benzile neutilizate trebuie să fie plasate înapoi în pachetul și închis. Stripurile desigilate trebuie utilizate în 7 zile.

Prezentarea kitului:

- Rapoarte;
- 10 pachete x 6 stripuri pentru 60 identificari;

Materialele suplimentare necesare:

Codul produselor	Denumirea
MB0209	Indole
MB0181	VP I
MB0184	VP II
MB0180	TDA
MB0186	NIT A
MB0187	NIT B
MB1093	Mineral Oil
MB0266 optional	Oxidase Strips

MB1244 Microbact™ Computer Aided Identification Sistem

Motility medium

2.5/5.0ml solutie salina, 0.85%

5.0ml apa peptonata

SR0035 Ser steril

Pudra de zinc

Anse

Pipete sterile

Incubator 35° ± 2°C fara - CO₂

Etapele de lucru:

Obtineti cultura pura de 18-24 ore pentru a putea efectua identificarea. Mediile adecvate pentru cultivare sunt: de exemplu MacConkey (CM0007), Eosin albastru de metilen (CM0069), Blood sau Chocolate (CM0331 și SR0050). Înainte de utilizare, se efectueaza testul la oxidază a tulpinei de identificat.

Notă: microorganismele oxidazo-pozitive nu pot fi identificate cu 12A panel, ele necesita panelul suplimentar 12B;

Procedura:

	12A (or 12E) Enterobacteriaceae	24E (12A (or 12E) + 12B) Enterobacteriaceae	24E (12A (or 12E) + 12B) Miscellaneous Gram- Negative Bacilli	
Oxidaza	Negativ	Negativ	Pozitiv	
Prepararea inocului	1-2 colonii 2.5 ml solutie salina	2-3 colonii 5.0 ml sol.salina	2-3 colonii 5.0ml sol.salina	Cind Actinobacillus sau Pasteurella spp. sunt suspectate, adaugati 1 picatura de ser steril la 1 ml de suspensie salina
Inocularea panelului	4 picaturi in fiecare godeu	4 picaturi in fiecare godeu	4 picaturi in fiecare godeu	
Ulei mineral deasupra	Godeu 1(lizina) Godeu 2 (ornitina) Godeu 3 (H ₂ S)	12B godeu 8 (arabinoza) 24E godeu 20(arabinoza) 12B godeu 12 (arginina) 24E godeu 24 (arginina)	12B godeu 12 (arginina) 24E godeu 24 (arginina)	
Temperatura de incubare	35° ± 2°C	35° ± 2°C	35° ± 2°C (25°C pentru Ps. fluorescente)	
Citirea testului: Cititi si inregistrati toate rezultatele positive	Adaugarea reactivilor: Godeu 8 – Indol = 2 picaturi Kovacs, cititi timp de 2 minute Godeu 10 – VP = cite 1 picatura per godeu, VPI si VPIL, cititi la 15 – 30 minute Godeu 12 – TDA = 1 picatura TDA, cititi imediat	Adaugarea reactivilor: Vezi 12A/12E Godeu 1 (12B) Godeu 13 (24E) Interpretati Gelatina la 24-48 ore Godeu 12 (12B) Godeu 24 (24E) Arginina Galben - Negativ Verde-albastrui - Pozitiv	Adaugarea reactivilor: Vezi 12A/12E Godeu 1 (12B) Godeu 13 (24E) Interpretati Gelatina la 48 ore Godeu 12 (12B) Godeu 24 (24E) Arginina Galben-verzui Negativ Albastru - Pozitiv	

1. Prepararea inocului:

Alegeți 1-3 colonii izolate de 18-24 ore și emulsionați în 2.5 ml soluție salină sterilă pentru panelul 12A/E sau 5.0 ml pentru 24E (12A/E și 12B). Mestecați bine pentru omogenizare.

În cazul în care microorganismul a fost crescut pe mediu selectiv și coloniile sunt scunde sau inhibate poate fi necesar să fie emulsionată în 5 ml apă peptonată și incubată la $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pentru 4 ore. Folosiți pipete Pasteur sterile pentru a transfera o picătură de apă peptonată cu cultură în soluție salină sterilă (0.85%).

2. Inocularea:

Panelul se descoperă prin înlăturarea peliculei. Așezați stripul pe o suprafață dreaptă și cu ajutorul pipetei Pasteur sterile adăugați 4 picături (aproximativ 100 μl) a suspensiei bacteriene în fiecare godeu. Picurați ulei mineral în primele 3 godeuri, după marcaj.

3. Incubare:

Închideți pelicula și marcați stripul. Incubați la $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 ore. Pentru a verifica puritatea inoculului faceți repicare pe un mediu solid non-selectiv.

4. Citirea rezultatului:

1. Testul 12A (12E) strip trebuie citit peste 18-24 ore.

2. Scoateți stripul din incubator și citiți rezultatul prin evaluarea culorii conform tabelului de mai jos.

5. Reacții suplimentare:

1. 12A (12E) or 24E

Adăugați la: godeul 8 (Indole productia) - 2 picături Indol (Kovacs) reagent. Citiți timp de 2 minute după adăugarea reagentului. Godeu 10 (Voges-Proskauer reacție) - adăugați 1 picătură de of VPI reagent și 1 picătură de VP11 reagent. Citiți rezultatul în 15 - 30 minute după adăugarea reagentului.

Godeu 12 (Tryptophan Deaminase) - adăugați 1 picătură de TDA reagent. Testul se citește imediat după adăugarea reagentului.

Teste adiționale:

Nitrate Reduction Test (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG))

Godeu 7 (ONPG) DUPĂ citirea reacției cu ONPG se adăuga 1 picătură de Nitrate reagent A și 1 picătură de Nitrate reagent B. Producția de o culoare **roșie** la câteva minute de la adăugarea de reactiv indică faptul că reducerea de nitrat de la nitrit (NO_2) a avut loc. O cantitate mică de pulbere de zinc ar trebui să fie adăugate la cele godeuri care prezintă o culoare galbenă după adăugarea reactivilor nitrat. Acest lucru va determina dacă nitrat a fost redus complet la gazul azot (N_2). Rezultatele ar trebui să fie interpretate după cum urmează:

După adăugarea de Nitrate reagent A și B:		
Culoare roșie	Pozitiv	NO_2 Pozitiv
Culoare galbenă	Negativ	NO_2 Negativ
După adăugarea prafului de zinc:		
Culoare galbenă	Pozitiv	(N_2 +)
Culoare roșie	Negativ	(N_2 -)

Toate microorganismele din familia Enterobacteriaceae reduc nitratii în nitrite și dau reacție pozitivă.

Note: Bacilii Gram-negativi care nu reduc nitritii nu pot fi identificați cu panelul 12A.

TABELUL CU SUBSTRAT SI REACTII (12A/12E/24E):

Godeu No.	Denumire	Principiu reactiei	Culoare		Commentarii
			Negativ	Pozitiv	
1	Lysine	Lysine decarboxylase	Galben	Albastru-verzui	Verde sau albastru sunt reactii pozitive. Bromothymol albastru indica formarea aminei specifice –cadaverinei.
2	Ornitina	Ornithine decarboxylase	Galben – verzui	Albastru	Verdele trebuie considerat ca reactie negativa.
3	H ₂ S	H ₂ S productia	Culoarea paiului	Negru	H ₂ S este produs thiosulphate.
4	Glucosa	Fermentarea glucozei	Albastru-verzui	Galben	Bromothymol albastru schimba culoarea in galben la virarea de pH spre acid.
5	Manitol	Fermentarea manitolului	Albastru-verzui	Galben	
6	Xyloza	Fermentarea xylozei	Albastru-verzui	Galben	
7	ONPG	Hydrolysis of o-nitrophenyl-β-d-galactopyranoside (ONPG) sub actiunea β-galactosidase	Incolor	Galben	β-galactosidase hydrolysis treansforma ONPG incolor in orth-onitrophenol galben.
8	Indol	Producerea de indol de catre tryptophan	Incolor	Roz-rosietic	Indolul se formeaza la metabolizarea tryptophanului..Reactivul Indole Kovacs formeaza complex roz-rosietic la reactia cu indolul.
9	Urea	Hidroliza ureei	Culoarea paiului	Roz-rosietic	Ammoniu rezultat in urma hidrolizei ureei induce cresterea pH si indicatorul rosu-fenol schimba culoarea din galben in roz-rosietic.
10	VP	Aceton productia (Voges-Proskauer reacta)	Culoarea paiului	Roz-rosietic	Acetona este produsa de catre glucoza si se formeaza un complex roz-rosietic dupa adaugarea a alpha-naphthol si creatinei.
11	Citrat	Utilizarea citratului (citratul este unica sursa de carbon)	Verde	Albastru	Citratul este unica sursa de carbon daca este utilizat creste pH-ul, culoarea migreaza de la verde la albastru a bromothymol albastru.
12	TDA	Producerea de indolepyruvate prin dezaminarea tryptophanului	Culoarea paiului	Rosu-visiniu	Microorganismele Indole pozitive pot produce culoare bruna. Aceasta este o reactie negativa.

Interpretarea:

Un system octal de codificare trebuie obtinut dupa citirea tuturor rezultatelor. Acest cod poate fi citit cu ajutorul sftului de la calculator.

Control de calitate:

<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC®19606

Rezultatele asteptate pe Microbact System dupa 18-24 h de incubare:

			<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC®19606
1	12E/A 24E	LYS	+	+	-	-
2		ORN	+	-	+	-
3		H2S	-	-	+	-
4		GLU	+	+	+	+
5		MAN	+	+	-	-
6		XYL	+	+	-	+
7		ONP	+	+	-	-
8		IDN	+	-	-	-
9		URE	-	+	+	-
10		VP	-	+	-	-
11		CIT	-	+	+	+
12		TDA	-	-	+	-

Limitări

1. Unele tulpini bacteriene pot avea reacții atipice biochimice din cauza cerințelor nutriționale neobișnuite sau mutații și poate fi dificil de identificat.

2. Reacțiile obținute prin utilizarea Sistemului Microbact poate diferi din cauza:

- incubare prelungită, incubare insuficientă, suspensie bacteriană insuficientă poate duce la rezultate false.
3. Specii cu frecvență redusă de apariție necesită teste suplimentare.

4. Interpretarea rezultatelor de identificare matematic calculat necesită personal instruit care ar trebui să folosească cunoștințele în legătură cu următoarele informații înainte de a accepta ID-ul unui organism: Gram-colorație, morfologie coloniale, sursa de izolare, probabilitate la sută (grad de separare), teste împotriva, indicații suplimentare de testare și rezultatele, frecvența de alegere ID și antibiograma.

6. Un test Gram și oxidază ar trebui să fie efectuate înainte de testare. În plus, motilitatea și testarea la nitrati ar trebui să fie efectuate pentru bacili Gram-negativi.

7. Când utilizați 12E / A benzi, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. și *Serratia* spp. ar trebui să fie raportate ca *Klebsiella* / *Enterobacter* / grup *Serratia*. Testele Motilitatea și DNase sunt recomandate pentru speciație în continuare a acestui grup. Includerea unei benzi 12B se recomandă.

8. Dacă speciația suplimentare necesare pentru spp *Yersinia*. (De exemplu, altele decât *Yersinia enterocolitica* și *Yersinia pseudotuberculosis*), testarea suplimentară este necesară.