

SK**SÚHRN A VYSVETLENIE**

GN 24 je štandardizovaný identifikačný systém pre bežnú druhovú identifikáciu Gram negatívnych paličiek, ktorý využíva 24-29 miniaturizovaných biochemických testov a internetovú databázu. Na konci návodu je uvedený kompletný zoznam všetkých mikroorganizmov, pre ktoré je súprava určená.

PRINCÍP

Súprava GN 24 pozostáva z 24 jamiek trojstriпов mikrotitračnej doštičky v klasickom 96 jamkovom formáte, ktoré obsahujú dehydratované substráty, pričom GN 24 sp je vo forme trojstriпов delenej - striповateľnej mikrotitračnej doštičky a GN 24 fp je vo forme nedelenej - celej mikrotitračnej doštičky. Rekonštitúcia substrátov prebieha inokuláciou bakteriálnej suspenzie. V priebehu inkubácie dochádza v dôsledku metabolickej aktivity mikroorganizmov k farebným zmenám v jednotlivých jamkách. Odpočet výsledkov testov prebieha vizuálne na základe farebnej stupnice, farebného vyjadrenia popísaného v pracovnom návode, alebo pomocou readeru. Výsledky identifikácie sa odčítajú z vyhodnocovacej tabuľky, alebo pomocou readeru alebo vyhodnocovacieho softwaru, ktorý nájdete na www.diagnostics.sk/idmicro.

OBSAH SÚPRAVY - 40 testov (sp) / 100 testov (fp)

- 10 / 25 mikrotitračných doštičiek GN 24
- 40 / 100 výsledkových formulárov
- 10 / 25 inkubačných sáčkov
- 1 príbalový leták

POTREBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ ČINIDLÁ A MATERIÁL**Činidlá:**

- Fyziologický roztok nepufrovaný 3,5-5 ml
- Parafínový olej (Ref. 3001)
- PHE reagent (Ref. 3007)
- PHS reagent (Ref. 3008)
- IND reagent (Ref. 3002)
- NIT reagent (Ref. 3005)
- VP a VP reagent (Ref. 2004) (Ref. 3004)
- Zn (Ref. 5001)
- OXI (Ref. 2001)
- PYR a PYR reagent (Ref. 2003) (Ref. 3003)
- Identifikačný software (na stránkach spoločnosti)

Materiál :

- Pipety
- Tampóny, kľučky, kahan, skúmavky a ďalšie základné vybavenie mikrobiologického laboratória

VAROVANIE A OPATRENIE

- Len pre diagnostické použitie *in vitro* a na mikrobiologickú kontrolu
- Len pre profesionálne použitie.
- Dodržujte presne pracovný návod !
- Akékoľvek vzorky a inokulované produkty sa musia považovať za potenciálne infekčné a je treba rešpektovať pri manipulácii s nimi obvyklé bezpečnostné opatrenia podľa predpisov platných vo vašej krajine.
- Nepoužívajte produkt po dátume expirácie.
- Pred použitím skontrolujte, či je obal nepoškodený. Poškodené súpravy nepoužívajte.

Pri interpretácii výsledkov je nutné vziať do úvahy anamnézu pacienta, zdroj vzorky, morfológiu kolónie, mikroskopickú morfológiu kmeňa a pokiaľ je to nevyhnutné, výsledky všetkých ďalších vykonaných testov, hlavne výsledkov antibiogramu.

PODMIENKY SKLADOVANIA

Diagnostické súpravy sa dodávajú vo viacvrstvových sáčkoch na báze hliníka a organických polymérov. Súčasťou každého sáčku je dodatkové silikagélové sušidlo. Uchovávajú sa pri teplote $+2$ až $+25^{\circ}\text{C}$.

Exspirácia je uvedená na každom balení. Po otvorení uložte nepoužitý zostatok mikrotitračnej doštičky do priloženého hliníkového sáčku vrátane originálneho silikagélového sušidla, sáčok starostlivo uzavrite a skladujte pri laboratórnej teplote.

Takto možno skladovať produkt po dobu 2 týždňov (alebo do dátumu expirácie v prípade, že nastane skôr).

VZORKY

Mikroorganizmy, ktoré majú byť identifikované izolujte z vhodného neselektívneho kultivačného média (napr. krvný agar, trypton – soya agar apod.) podľa štandardných mikrobiologických techník. Z čistej kultúry urobte Gramovo farbenie a mikroskopiu. Urobte test dôkazu cytochromoxidázy – OXI (prípadne katalázový test – CAT). Konfirmované izoláty identifikujte na súprave GN 24.

PRACOVNÝ POSTUP**Príprava inokula**

- Otvorte skúmavku fyziologického roztoku alebo použite akýkoľvek sterilný 0,85 % roztok chloridu sodného.
- Bakteriologickou kľučkou alebo tampónom naberte z čistej a dobre narastenej 18 - 24 hod. kultúry niekoľko dobre izolovaných kolónií. Zákal riadne homogenizovanej suspenzie musí zodpovedať hustote zákalu 2 McF. Táto suspenzia sa musí použiť ihneď po príprave.

TIP: V prípade potreby urobte overenie čistoty inokula krížovým rozterom rovnakou kľučkou alebo tampónom, ktorým ste pripravovali suspenziu.

Takto pripravená Petriho miska môže slúžiť k vykonaniu doplnkových testov nasledujúci deň!

Príprava mikrotitračnej doštičky

- Pripravte si mikrotitračnú doštičku
- Zaznamenajte na ňu čísla vyšetrovaných kultúr

TIP: V prípade prvého použitia súpravy GN 24 sp vyberte nepotrebné stripy a vložte do hliníkového sáčku so sušidlom a starostlivo uzavrite. Pre ďalšie použitie si ponechajte rámček mikrotitračnej doštičky.

Inokulácia

- Inokulujte 0,1 ml riadne homogenizovanej suspenzie do každej jamky monstripu.
- Testy URE až LYS (jamky H až C) prekryte tromi kvapkami parafínového oleja. Test GLU (jamka G) prekryte štyrmi kvapkami parafínového oleja.

Inkubácia

- Vložte mikrotitračnú doštičku do priloženého PE sáčku ktorého koniec zahnite pod doštičku – zabránite tým vysychaniu bakteriálnej suspenzie.
- Inkubujte pri bežnej atmosfére a teplote $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 - 24 hodín.

TIP: pre optimálny priebeh inkubácie zaistíte v inkubátore vyššiu vlhkosť vložení napr. kadičky s čistou vodou alebo vykonávajúte inkubáciu pri riadenej úrovni vlhkosti.

Pri podozrení na prítomnosť nefermentujúcich paličiek odčítajte test GLU po 4 hodinách. Test GLU môže pri niektorých metabolicky aktívnejších nefermentujúcich paličkách vykazovať pozitivitu po 24 hodinovej inkubácii. Do identifikačného programu zaznamenajte výsledok získaný po 4 hodinách inkubácie.

V prípade nepreukázateľného vyfarbenia testov v jamkách zodpovedajúcim sacharidom - je možné predĺžiť inkubáciu u nefermentujúcich paličiek (test GLU je po 4 - 24 hodinách negatívny) na 48 hodín.

HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Po dobe inkubácie vyhodnoťte testy pomocou odčítacej tabuľky, farebnej stupnice alebo výsledkov kontrolných kmeňov.

Testy NAG / IND, GLR / ESL, bGL / PHE, GGT / PHS a bGA / NIT sú bifunkčné a po odčítaní primárnej reakcie možno získať zakvapkaním

príslušnými činidlami druhý výsledok z už odčítanej jamky mikrotitračnej doštičky.

V prípade potreby urobte nasledujúce bifunkčné testy:

Jamka H2: NAG / IND – prikvapnite 2 – 3 kvapky IND – reagentu a počkajte 1 – 2 minúty na vyfarbenie testu.

Jamka H3: GLR / ESL – odčítajte pozitívny test GLR pre *E. coli*. Zaznačte tiež negatívny výsledok testu GLR.

Farba	Výsledok GLR	Výsledok ESL
Bez zafarbenia / krémová	-	-
Žltá	+	-
Hnedá	-	+

Test nevyžaduje prídavok žiadneho reagentu! Zapisujte vždy oba výsledky, nielen pozitívny výsledok!

Jamka A1: bGL / PHE – prikvapnite 1 kvapku činidla PHE a vyhodnoťte.

Jamka A3: bGA / NIT – prikvapnite 2 kvapky NIT – reagentu a vyhodnoťte. V prípade negatívnej reakcie testu NIT, pridajte do jamky zinkový prach (Ref. 5001) (na špičku 1µl inokulačnej kľučky). Ak sa jamka sfarbí do červena do 10 minút test NIT je negatívny.

Pre nefermentujúce paličky urobte navyše test

Jamka A2: GGT / PHS – prikvapnite 1 – 2 kvapky PHS – reagentu a vyhodnoťte

- Zapište výsledok bifunkčného testu do formulára pre odpočet výsledkov alebo do vyhodnocovacieho softwaru
- V prípade identifikácie Gram negatívnych, oxidáza negatívnych, glukózu nefermentujúcich paličiek zaznamenajte do softwaru výsledok testu bHEM (beta hemolýza), YEP (produkcia žltého pigmentu) a G42 (rast pri 42°C), čím výrazne zvýšite pravdepodobnosť identifikácie tejto skupiny mikroorganizmov.

IDENTIFIKÁCIA

Identifikácia pomocou identifikačnej tabuľky:

Porovnajte výsledky testov a urobte vyhodnotenie podľa interpretačnej tabuľky na str.6 a výsledkov testov uvedených v tomto návode na strane 7.

Identifikácia pomocou identifikačného softwaru:

Zadajte výsledky jednotlivých testov.

V prípade, že nemožno niektorý z testov hodnotiť je možné ho v programe vynechať. Software umožňuje vkladanie dodatkových testov a tým i zvýšenie identifikačnej účinnosti. Software microID je pre zákazníkov voľne k dispozícii na stránkach spoločnosti.

Identifikácia pomocou automatického readeru.

KONTROLA KVALITY

Kvalita vyrábaných diagnostických súprav sa systematicky kontroluje. Chemikálie sú nakupované len od certifikovaných firiem a kvalita týchto chemikálií je overená doloženým analytickým certifikátom. Funkčnosť súprav je okrem iného testovaná na kontrolných zbierkových kmeňoch, kontrolovaná a testovaná je tiež prítomnosť bakteriálnej kontaminácie. Súpravy sú podrobované záťažovým testom pri zvýšenej teplote a z každej šarže sú ukladané referenčné vzorky pre správne posúdenie prípadných neskorších reklamácií.

Pre potrebu vlastného overenia funkčnosti súpravy odporúčame použiť kontrolné kmene uvedené na str.5.

OBMEDZENIE METÓDY A NAJČASTEJŠIE PRÍČINY NEÚSPECHU IDENTIFIKÁCIE

- Diagnostická súprava GN 24 je určená len na identifikáciu baktérií uvedených v tomto návode.
- Možno použiť len čistú kultúru vyšetřovaného mikroorganizmu.
- Testy neboli prevrstvené parafinovým olejom.
- Kontaminácia jamiek inokulom z ďalšieho stripu.
- Jedná sa o atypický kmeň.
- Nedodržanie niektorého bodu pracovného návodu.

CHARAKTERISTIKY STANOVENIA

Bolo testovaných 150 zbierkových kmeňov a kmeňov klinického pôvodu, ale i veterinárnych kmeňov patriacich k druhom zahrnutým v databáze:

GLU fermentujúce paličky

- 92 / 88 % kmeňov bolo správne identifikovaných s dodatkovými testami
- 89 / 87 % kmeňov bolo správne identifikovaných bez dodatkových testov

GLU nefermentujúce paličky

- 96 / 87 % kmeňov bolo správne identifikovaných s dodatkovými testami
- 81 / 74 % kmeňov bolo správne identifikovaných bez dodatkových testov

Pozn. údaj pred / za lomítkom zodpovedá rodovej / druhovej identifikácii.

LIKVIDÁCIA ODPADU

S materiálom zaobchádzajte ako s potenciálne infekčným agens. Odpad likvidujte podľa interných operačných postupov a smerníc v súlade s legislatívou svojej krajiny.

Komponenty súpravy neobsahujú nebezpečné látky.

EN

SUMMARY AND EXPLANATION

GN 24 is standardized identification system for common species of Gram negative bacteria, it is based on 24-29 miniaturized biochemical tests and internet database. List of all microorganisms, for which is kit determined, is placed at the end of leaflet.

PRINCIPLE

Kit GN 24 consists of 24 wells strip of microtitration plate in classic 96 wells format containing dehydrated substrates, where GN 24 sp is in the form of strippable microtitration plates and GN 24 fp is in the form of undivided full plate. Reconstitution of substrates is carried by inoculation of bacterial suspension. During incubation occurs colour change in wells because of metabolic activity of microorganisms. Evaluation of test results could be done by automatic reader or visually on base of colour scheme, or by colour description stated in leaflet. Results of identification can be obtained from evaluation table or by help of evaluation software, which can be found at www.diagnostics.sk/idmicro.

KIT CONTAINS - ACCORDING TO PACKAGING 40 TESTS (sp) / 100 TESTS (fp)

- 10 / 25 microtitration plates of GN 24
- 40 / 100 result forms
- 10 / 25 incubation packets
- 1 information leaflet

REQUIRED MATERIAL

Reagents:

- Unbuffered saline 0,85 %, 3,5-5 ml
- Paraffin oil (Ref. 3001)
- PHE reagent (Ref. 3007)
- PHS reagent (Ref. 3008)
- IND reagent (Ref. 3002)
- NIT reagent (Ref. 3005)
- VP and VP reagent (Ref. 2004 and 3004)
- Zn (Ref. 5001)
- OXI (Ref. 2001)
- PYR and PYR reagent (Ref. 2003 and 3003)
- Identification software (on website of the company)

Materials:

- Pipettes
- Tampons, loops, burner, tubes and other basic laboratory equipment.

WARNINGS AND SAFETY PRECAUTIONS

- **For in vitro diagnostics use and microbial control**
- **For professional use only**
- Follow the instructions exactly!
- Used strips should be considered as potentially infectious and this must be respected when handling.

- Observe common safety measures according to the regulations of your country.

By interpretation of results anamnesis of a patient, source of sample, morphology of colony, microscopic morphology of strain and if necessary, results of all performed tests, mainly results of antibiogram have to be considered.

STORAGE CONDITIONS

Diagnostic kits are delivered in multilayer sachets based on aluminium and organic polymers. Part of each packet is silica gel desiccant. Store kits at temperature from +2 to +25°C. Expiration date is placed on each packaging.

Put unused microtitration strip in packed Al sachet with original silica gel desiccant, close sachet carefully and store at room temperature. Product can be stored for two weeks after opening of original Alu sachet.

SAMPLES

Isolate microorganisms, which have to be identified, from suitable unselective cultivation medium (for example blood agar, trypton - soya agar etc.) according to standard microbiological techniques.

Make Gram staining and microscopy of pure culture.

Make test of cytochromoxidase – OXI (eventually catalase test - CAT) Identify confirmed isolates on GN 24 kit. These tests are not a part of kit.

RECCOMENDED PROCEDURE

Preparation of inoculum

- Open the tube with saline or use sterile 0,85% solution of sodium chloride in deionized / distilled water.
- Take same well isolated colonies by inoculation loop from pure 18-24 hours old culture.
- Prepare well homogenized suspension of turbidity of 2 McF. Use suspension immediately after preparation.

TIP: Eventually make proof of purity by braying of same loop or tampon, by which was suspension done.

Prepared Petri dish can be used next day to make other additional tests!

Preparation of microtitration plate

- Prepare microtitration plate
- Mark strips with numbers of examined cultures.

TIP: When using GN 24 sp, take unused strips, put it to original aluminium packet with desiccant and close carefully.

Save frame of microtitration plate after incubation for next use.

Inoculation

- Inoculate 0,1 ml of well homogenized suspension into each well of strip.
- Cover tests from URE to LYS (wells from H to C) with three drops of paraffin oil. Cover test GLU (well G) with four drops of paraffin oil.

Incubation

- Put the microtitration plate to packed PE packet, then bend end of packet under plate – this avoid drying of bacterial suspension.
- Incubate by common atmosphere at temperature 35 ± 2 °C for 18 - 24 hours.

TIP: For optimal incubation conditions, make higher humidity in incubator, for example by adding beaker of clear water or incubate in incubator with managed humidity.

In suspicion for presence of nonfermenting rods, evaluate test GLU after 4 hours. Test GLU can show positive results after 24 hours of incubation by some of metabolically more active rods. In identification program use result of GLU obtained after 4 hours of incubation.

In case of unverifiable colouring of tests in wells corresponding to carbohydrates – elongate incubation of nonfermenting bacteria (test GLU is after 4 - 24 hours negative!) to 48hours.

EVALUATION AND INTERPRETATION

Evaluate the tests after incubation with help of interpretation table, colour scheme, or by results of control strain.

Tests NAG / IND, GLR / ESL, bGL / PHE, bGA / NIT and GGT / PHS are bifunctional so after evaluation of primary reaction another result can be obtained from evaluated well of microtitration plate.

Make following bifunctional test:

Well H2: NAG / IND - add 2-3 drops of IND reagent and wait 1-2 minutes for colouring of test.

- Before use, check if the packaging is intact. Do not use damaged kit.

Well H3: GLR / ESL - evaluate positive test GLR for *E. coli*. Mark the negative result of the test GLR also.

Colour	Result GLR	Result ESL
No colour / creamy	-	-
Yellow	+	-
Brown	-	+

Test does not require reagent addition! Write both results GLR and ESL separately, not only result of positive test!

Well A1: bGL / PHE - add 1 drop of reagent PHE and evaluate.

Well A3: bGA / NIT - add 2 drops of NIT reagent and evaluate. In case of negative reaction of test NIT add Zinc dust to well (on tip of 1 µl loop). If it shows red colour till 10 minutes - test NIT is negative.

For nonfermenting bacteria make also following bifunctional tests:

Well A2: GGT / PHS - add 1-2 drops of PHS reagent and evaluate.

- Write down result of bifunctional tests to result form or to evaluating software.
- In case of identification of gram negative, oxidase negative, glucose nonfermenting bacteria write down to software results of test bHEM (beta hemolysis), YEP (yellow pigment production) and G42 (42°C growth), this significantly increases identification of this group of microorganisms.

IDENTIFICATION

Result of identification can be obtained by:

- identification table or identification software

Identification by identification table:

Compare results of tests and make identification by interpretation table (page 6) and by results of tests in identification table (page 7).

Identification by identification software:

Enter results of individual tests. When some of the test cannot be evaluated, it can be excluded. Software allows inputting additional tests and so it increases identification effectiveness.

Software microID is available free for our customers on the website of the company.

Identification by reader.

QUALITY CONTROL

Quality of produced diagnostic kits is systematically controlled. Chemicals are bought exclusively from certified companies and quality of these chemicals is confirmed by analytical certificate. The functionality of the kits is tested by control collection strains, controlled and tested is also present of bacterial contamination. Kits are exposed to tests of higher temperatures and samples of each batch are saved for right advisement of later reclamations.

For the need of own proof function, use recommended bacterial strains on the page 5.

CONSTRAINTS OF METHOD AND MOST OFTEN CAUSES OF WRONG IDENTIFICATION

- Diagnostic kit GN 24 is determined for identification of bacteria's named in this leaflet only.
- Only pure culture of microorganism can be used.
- Tests were not covered by paraffin oil.
- Contamination of wells by inoculum of next strip.
- Used culture is atypical strain.
- Some point of leaflet was not kept.

DETERMINATION CHARACTERISTICS

150 collection strains, strains of clinical background, and veterinary strains mentioned in database were tested:

GLU fermenting bacteria

- 92 / 88 % strains were identified correctly with additional tests
- 89 / 87 % strains were identified correctly without additional tests

GLU nonfermenting bacteria

- 96 / 87 % strains were identified correctly with additional tests
- 81 / 74 % strains were identified correctly without additional tests

Note: Data before / after slash response to genus / species identification.

WASTE LIQUIDATION

Work with material as with potentially infectious agents. Liquidate leavings according to internal procedures and legislative of your country. Kit components does not contain dangerous chemicals.

CZ**SOUHRN A VYSVĚTLENÍ**

GN 24 je standardizovaný identifikační systém pro běžnou druhovou identifikaci Gram negativních tyčků, který využívá 24-29 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 trojstripu 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 readerem, nebo vizuálně na základě barevné stupnice nebo barevného vyjádření popsaného v pracovním návodu. Výsledky identifikace se odečtou z vyhodnocovací tabulky, nebo pomocí 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)
- PHE reagent (Ref. 3007)
- 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 přesné pracovní návody!
- Veškeré vzorky a inokulované produkty se musí považovat za potenciale 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, morfoloii kolonie, mikroskopickou morfoloii 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**. Expirace 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 sůpravě 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 tyčků odečtete test GLU po 4 hodinách. Test GLU může při některých metabolicky aktivnějších nefermentujících tyčků 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 tyčků (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*

Barva	Výsledek GLR	Výsledek ESL
Bezbarvá / krémová	-	-
žlutá	+	-
hnědá	-	+

Test nevyžaduje přidavek žádného reagentu! Zapisujte vždy oba výsledky, nejen pozitivní výsledek!

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

Jamka A3: bGA / NIT – prikápněte 2 kapky NIT – reagentu a vyhodnoťte. V případě negativní reakce testu NIT, přidejte do jamky zinkový prach (Ref. 5001) (na špic 1 µl inokulační kličky). Když se jamka zabarví do červena do 10 minut test NIT je negativní.

Pro nefermentující tyčky provedte navíc následující bifunkční test:

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

- Zapište výsledek bifunkčního testu do formuláře pro odečet výsledků nebo do vyhodnocovacího software
- V případě identifikace Gram negativních, oxidáza negativních, glukózu nefermentujících tyček zaznamenejte do softwaru výsledek testu bHEM (beta hemolýza), YEP (produkce žlutého pigmentu) a G42 (růst při 42°C), čímž výrazně zvýšíte pravděpodobnost identifikace této skupiny mikroorganismů.

IDENTIFIKACE

Výsledek identifikace se získá pomocí:

- identifikační tabulky, identifikačního softwaru nebo readerem

Identifikace pomocí identifikační tabulky

Srovnajte výsledky testů a proveďte vyhodnocení dle interpretační tabulky na str.6 a výsledků testů uvedených v tomto návodu na straně 7.

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.

Identifikace readerem

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 kmelech, 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 kontrolní kmeny na str. 5.

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 potencionálně infekčním agens. Odpad likvidujte dle interních operačních postupů a směrnice v souladu s legislativou své země.

Komponenty soupravy neobsahují nebezpečné látky

KONTROLNÉ KMENE / CONTROL STRAINS / KONTROLNÍ KMENY

<i>Escherichia coli</i>	CCM / ATCC 4225 / 35218	URE	GLU	H ₂ S	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
+	-	+/-	-	+	+	-	-	+	+		

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCM / ATCC 5852 / 13882	URE	GLU	H ₂ S	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
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

<i>Proteus sp.</i>	CCM / ATCC 1799 / -	URE	GLU	H ₂ S	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
-	-	-	-	-	+	-	-	-	+		

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM / ATCC 3955 / 27853	URE	GLU	H ₂ S	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, ČR, tel. +420549491430, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Profily získané po 24 hodinách inkubace po kultivaci na krvnom, alebo trypton - soyovom agare. Kontrolné kmene slúžia len k overeniu funkčnosti jednotlivých testov, a nie na kontrolu správnosti identifikácie

Profiles obtained after 24 hour incubation on blood or trypton-soya agar.

Control strains serves to check functionality of individual tests only, not for proof control of identification.

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

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV / INTERPRETATION TABLE / INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

JAMKA / WELL / JAMKA - 1. riadok / line / řádek	SKRATKA TESTU / TEST SHORTCUT / ZKRATKA TESTU	NÁZOV TESTU / TEST NAME / NÁZEV TESTU	VÝSLEDEK TESTU / TEST RESULT / VÝSLEDEK TESTU	
			NEGATÍVNI / NEGATIVE / NEGATIVNÍ	POZITÍVNY / POSITIVE / POZITIVNÍ
H	URE	Urea	žltá, oranžová / yellow, orange / žltá, oranžová	červená, ružová / red, pink / červená, růžová
G	GLU	Glucose / Glukóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
F	H2S	Hydrosulphide / Sirovodík	zákal suspenzie / suspension turbidity / zákal suspenze	čierna, šedočierna / black, black-grey / černá, šedočerná
E	ARG	Arginine / Arginin	Zelená / green / zelená	modrá / blue / modrá
D	ORN	Ornithine / Ornitin	žltá, zelená / yellow, green / žltá, zelená	modrá / blue / modrá
C	LYS	Lysine / Lyzin	žltá, zelená / yellow, green / žltá, zelená	modrá / blue / modrá
B	SCI	Simmons citrate / Simmons citrát	žltá, zelená / yellow, green / žltá, zelená	modrá / blue / modrá
A	bGL	b- glucoronidase / b-glukosidáza	Bezfarebná / colourless / bezbarevná	žltá / yellow / žltá
A´	PHE	Phenylalanine / Fenylalanin	žltá, zákal suspenzie / yellow, suspension turbidity / žltá, zákal suspenze	tmavo zelená, zelená / dark green, green / tmavě zelená / zelená
JAMKA / WELL / JAMKA - 2. riadok / line / řádek	ZKRATKA TESTU	NÁZOV TESTU / TEST NAME / NÁZEV TESTU	NEGATÍVNI / NEGATIVE / NEGATIVNÍ	POZITÍVNY / POSITIVE / POZITIVNÍ
H´	IND	Indol	žltá, ružová / yellow, pink / žltá, ružová	červená, červenooranžová / red, red-orange / červená, červenooranžová
H	NAG	N-acetyl-glucosaminide / N-acetyl-glukosaminid	bezfarebná / colourless / bezbarevná	žltá / yellow / žltá
G	SUC	Sucrose / Sacharóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
F	TRE	Trehalose / Trehalóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
E	MAN	Mannitol / Manitol	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
D	LAC	Lactose / Laktóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
C	CEL	Celobiose / Celobióza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
B	MAL	Malonate / Malonát	žltá, zelená / yellow, green / žltá, zelená	modrá / blue / modrá
A	GGT	Gamma glutamyl transferase / transferáza	Bezfarebná / colourless / bezbarevná	žltá / yellow / žltá
A´	PHS	Phosphatase / Fosfatáza	žltá, zákal suspenzie / yellow, suspension turbidity / žltá, zákal suspenze	ružová / pink / růžová
JAMKA / WELL / JAMKA - 3. riadok / line / řádek	ZKRATKA TESTU	NÁZOV TESTU / TEST NAME / NÁZEV TESTU	NEGATÍVNI / NEGATIVE / NEGATIVNÍ	POZITÍVNY / POSITIVE / POZITIVNÍ
H´	GLR	b-glukuronidase / b-glukuronidáze	bezfarebná / colourless / bezbarevná	žltá / yellow / žltá
H	ESL	Aesculine / Eskulín	béžová / bledě hnědá	tmavě hnědá
G	DUL	Dulcitol	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
F	ADO	Adonitol	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
E	SOR	Sorbitol	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
D	RHA	Rhamnose / Ramnóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
C	RAF	Raffinose / Rafinóza	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
B	INO	Inos(z)itol	zelená / green / zelená	žltá, žlutozelená / yellow, yellow-green / žltá, žlutozelená
A	bGA	b-galactosidase / b-galaktosidáza	zákal suspenzie / suspension turbidity / zákal suspenze	žltá / yellow / žltá
A´	NIT	Nitrates / Nitráty	žltá, zákal suspenzie / yellow, suspension turbidity / žltá, zákal suspenze	tmavo ružová, červená / dark pink, red / tmavě růžová, červená

Dátum poslednej revízie / Last revision date / Datum poslední revize : 20. 2. 2019

www.diagnostics.sk, e-mail : info@diagnostics.sk

