

MID 葡萄球菌生化鉴定系统

(MID-69 STAPH ID)

使用说明书



广东环凯微生物科技有限公司
广东省微生物研究所

STAPH ID 鉴定条使用流程:

确认	操作: 革兰氏染色 (革兰氏阳性葡萄球菌), 触酶 (触酶阳性) 和乳胶凝集并注意菌落颜色。
接种物	从纯培养物中挑取一个菌落于悬浮培养基中
接种量	每个小管中加 3-4 滴 (约 100 μ l) 菌悬液
矿物油覆盖	管 10 (尿素) 和管 11 (精氨酸)
培养时间	18-24 小时
培养温度	35-37 $^{\circ}$ C
初读结果	读取反应结果并记录颜色变化
添加配套试剂	管 9 (硝酸盐): 加一滴 NitrateA 和一滴 NitrateB(在读取 β -葡糖苷酸酶的反应结果后), 在 30-60 秒后读取结果 管 12 (PYR): 加 1 滴 PYR 试剂, 10 分钟后读取结果
记录最后结果, 并使用 Microgen 鉴定系统软件得到鉴定结果	

注: 在反应小管上部有黑色圈, 表示培养前需用矿物油覆盖; 有绿色圈, 表示培养后需要添加配套试剂。

用途:

STAPH ID 鉴定条使用了 12 种标准生化底物来鉴定医学中重要的葡萄球菌, 本鉴定系统用于体外诊断, 在专业实验室中使用。

鉴定原理:

STAPH ID 的鉴定条包括 12 种标准生化反应底物, 这些反应底物是经过电脑分析已公开发表的有关葡萄球菌类的数据库资料 (2,3,4) 而选择使用的 (1)。在每个小管中添加用所提供的悬浮肉汤制备的菌悬液, 如果小管中的试剂被细菌代谢, 就会在培养期间或添加其它特定的配套试剂后出现颜色变化 (见反应结果对照表)。MID 鉴定系统软件(MID-60)通过分析反应结果, 得出鉴定结果。

原装整套试剂包括 (20 次检测):

20 条鉴定条, 20 瓶葡萄球菌悬浮肉汤, 鉴定条培养槽, 结果记录报告单, 使用说明书。

其它必备品 (未在套装中提供):

鉴定系统软件 (MID-60) 1.1.16.19 版本或以上, 矿物油 (或无菌液体石蜡油), Nitrate A&B 试剂, PYR 试剂, Microgen[®] 葡萄球菌乳胶凝集试剂, 无菌滴管和接菌环, 革兰氏染色试剂, 过氧化氢试剂 (触酶反应), 无风扇辅助的培养箱 (35-37 $^{\circ}$ C), 酒精灯, 显微镜, 显微镜用玻片。

MID 鉴定系统软件(MID-60)提供的鉴定结果基于可能性分析, %几率和特性分析, 软件帮助菜单提供详细的解释。若无葡萄球菌的数据资料, 可从 Microgen 生物产品网站 (www.microgenbioproducts.com) 升级获得。

注意事项:

安全:

1. 鉴定系统包括的试剂只能用于体外诊断;
2. 应小心处理将要丢弃的病原物, 使用过的材料必须小心高压灭菌, 焚化或浸于消毒剂中杀菌, 如浓度 3% 的次氯酸钠浸泡 30 分钟。酸性的液体废弃物必须经过中和处理;
3. 小心处理带腐蚀性和刺激性的配套试剂, 请参考试剂瓶上的标签。

步骤:

1. 应按照说明书使用 STAPH ID 系统;
2. 反应试剂条不能在二氧化碳培养箱中培养;
3. 错误接种, 不正确的接种量或接种浓度可能会导致错误结果。

储存和有效期:

试验条应储存于 2-8℃ 条件, 当没有打开铝箔袋时, 鉴定条可储存至包装上所标明的有效期; 若已经打开铝箔袋, 则使用提供的封口工具, 并放置干燥剂于袋内, 在 2-8℃ 下可保存 14 天。

培养物:

必须使用培养 18-24 小时的纯培养物进行鉴定。

使用说明:

接种和培养:

1. 首先进行革兰氏染色 (革兰氏阳性球菌), 触酶试验 (触酶阳性) 和乳胶凝集试验 (Microgen® 葡萄球菌乳胶凝集试剂) 或者玻片凝集试验 (LAT), 以确认该培养物是否属于葡萄球菌属。注意观察菌落色素产生 (CPG);
2. 从分离平板上挑取纯的单个菌落至所提供的悬浮培养基中, 彻底混匀;
3. 小心地打开鉴定条的粘性封口膜 (但不要丢掉);
4. 用经消毒过的滴管向鉴定条上的每个小管中加 3-4 滴菌悬液 (大约 100 μ l);
5. 加 1 滴菌悬液到适当的非选择性培养基平板中, 置于 35-37℃ 有氧环境中培养 18-24 小时, 进行纯度检验。
6. 接菌后, 加 3-4 滴的矿物油于管 10 和 11 中覆盖, 这些管的上部有黑色圈作为标志, 有助于将矿物油加到正确的管中。
7. 用粘性封口膜封住管口, 放至 35-37℃ 的培养箱中培养, 在培养 18-24 小时后读取反应结果。

读取结果和添加配套试剂:

1. 打开粘性封口膜, 对照结果对照图和反应结果对照表 (包含在此说明书中), 将所有的阳性结果记录于报告单上。
2. 添加配套试剂:
 - a) 向管 12 中加入 1 滴 PYR 试剂, 10 分钟后读取结果。若为深粉红或红色, 则是阳性。
 - b) 在读取、记录管 9 β -葡萄糖苷酸酶反应结果后, 在管 9 中进行硝酸盐还原试验, 即在管 9 中加入 1 滴 NitrateA 和 1 滴 NitrateB 试剂, 在 60 秒后读取结果。如果显红色, 则证明硝酸盐被还原成亚硝酸盐。
3. 在所提供的表格中填写结果 (9a 和 12)。

软件分析:

在 STAPH ID 的结果记录单上, 所有反应都被分配在五个三元组中, 每个反应下面均标有对应的数值 1、2、4, 将每组中阳性反应对应的数值加起来, 将得到一个 5 位数编码, 将这个数值输入 MID 鉴定软件系统 (MID-60) 中, 系统将显示出数据库中 5 个最接近结果的菌种, 从而得到鉴定结果;

STAPH ID 鉴定条和外加试验结果可生成 1 个 5 位数 (结果记录单如下)。

MICROGEN STAPHYLOCOCCUS-ID 12 TEST															
REPORT FORM															
Lab. No. 11239			Specimen Type: <u>Wound Swab</u>												
			Date: <u>13th October 2005</u>												
Staphylococcus ID															
Well Number			9a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction	LAT	CPG	NIT	SUC	TRE	MAN	NAG	MNS	TUR	PHO	βGL	βGN 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: <u>14046</u> Final Identification: <u>Staph. epidermidis</u>															

产品使用局限性:

1. 结果的解释应由临床医生结合临床和实验室所有可应用的信息进行分析;
2. STAPH ID 只能用于鉴定数据库中包含的菌株, 不能鉴定其它的细菌。
3. 要使用纯培养的单菌落进行鉴定, 否则可能导致错误结果;
4. STAPH ID 可能会得到不同于其它已公开的数据结果, 这是因为所选择的底物配方或试剂不同;
5. 有些培养物可能产生非典型的生化反应, 鉴定比较困难;
6. 电脑鉴定结果应由受过适当培训的人员解读;
7. 在分析最后鉴定结果时, 应考虑菌株来源、革兰氏染色、菌群形态以及附加试验, 其它的一些反应。
8. 菌落色素的产生 (CPG) 和葡萄球菌胶乳凝集试验 (LAT) 或使用适当的血浆 (如兔血浆) 做玻片凝集试验, 这些试验需在接种到鉴定条之前进行, 这样才可以得到一个 5 位数的结果, 而使用 MID-STAPH 系统软件时必须是一个 5 位数。

质量控制:

STAPH ID 系统的鉴定性能应用适当的质控菌株进行检验, 建议用以下的菌株进行质控。

<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8530/ ATCC 12598	金黄色葡萄球菌
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047/ ATCC 14990	表皮葡萄球菌
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> NCTC 7292/ ATCC 15305	腐生葡萄球菌

	L A T	C A P T	N I T	S U C	T R E	M A N	N A G	M N S	T U R	P H O	B G L	B 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/ATCC14990	-	-	+	+	-	-	-	V	+	-	-	+	+	-	
<i>S. saprophyticus</i> NCTC7292/ATCC15305	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	

数据库

STAPH ID 是基于标准生化测试方法, 分析反应特性的数据来源于已发表的文献资料 (2, 3, 4)。

性能特点:

STAPH ID (MID-69) 对细菌培养物的鉴定性能与其他成熟的商业产品进行了比较, 结果如下 (共包括 108 个典型的葡萄球菌菌株):

培养物	总数	MID-69	其它产品
<i>S. aureus</i> 金黄色葡萄球菌	45	45	45
<i>S. epidermidis</i> 表皮葡萄球菌	19	19	19
<i>S. haemolyticus</i> 溶血葡萄球菌	12	11	12
<i>S. simulans</i> 模仿葡萄球菌	8	8	8
<i>S. capitis subsp. Capitis</i> 头状葡萄球菌头状亚种	3	3	3
<i>S. capitis subsp. urealyticus</i> 头状葡萄球菌解脲亚种 菌解脲亚种	2	2	2
<i>S. warneri</i> 沃氏葡萄球菌	5	5	5
<i>S. saprophyticus</i> 腐生葡萄球菌	2	2	2
<i>S. ludergensis</i>	2	2	2
<i>S. chromogenes</i> 产色葡萄球菌	2	2	2
<i>S. hominis</i> 人葡萄球菌	3	3	3
<i>S. cohnii subsp. Cohni</i> 孔氏葡萄球菌	1	1	1
<i>S. lentus</i> 缓慢葡萄球菌	1	1	1
<i>S. xylosus</i> 木糖葡萄球菌	1	1	0
<i>S. caprae</i> 山羊葡萄球菌	1	1	1
<i>S. auricularis</i> 耳葡萄球菌	1	1	1
总数	108	107	107

性能稳定性:

批内: 同一株细菌培养物由三批 STAPH ID 产品测试, 每一批产品由不同的操作人员在不同时间不同场合进行测试, 所得结果的一致性在 99%以上。

批间: 五株不同的细菌培养物由三批 STAPH ID 产品进行鉴定, 所得结果一致性在 99%以上。

参考文献

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, 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

反应结果对照表:

管编号	反应	描述	阳性	阴性
1	蔗糖 Sucrose	发酵糖产酸, 使酚红指示剂由红变黄	黄/桔黄色	红色
2	海藻糖 Trehalose			
3	甘露醇 Mannitol			
4	乙酰氨基葡萄糖 N-Acetyl Glucosamine			
5	甘露糖 Mannose			
6	松二糖 Turanose			
7	碱性磷酸酶 Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶水解对硝基苯磷酸生成黄色的对硝基苯酚	黄色	无色
8	葡糖苷酶 Glucosidase	β -葡糖苷酶水解对硝基苯基 β -D-吡喃葡糖苷生成黄色的邻硝基苯酚	黄色	无色
9	葡糖醛酸酶 Glucuronidase	β -葡糖醛酸酶水解邻硝基苯基 β -D-葡糖醛酸苷生成黄色的对硝基苯酚	黄色	无色
9	硝酸盐 Nitrate	硝酸盐还原成亚硝酸盐, 在添加甲萘胺和对氨基苯磺酸时生成红色化合物	红色	黄色
10	尿素 Urease	尿素水解产胺, 使 pH 上升, 酚红由黄变为深红色	深粉红色	黄色至浅粉红色
11	精氨酸 Arginine	在精氨酸双水解酶作用下, 精氨酸生成鸟氨酸、氨和 CO ₂ , 使 pH 上升, 指示剂溴麝香草酚蓝由绿色变为蓝色, 24 小时: 48 小时:	绿/蓝色 蓝色	黄色 黄/绿色
12	PYR	吡咯烷酮基芳胺酶水解 L-吡咯烷酮基- β -萘酰胺	红/深粉色	无色/浅粉色
	乳胶凝集试验 LAT	检测凝固酶和 A 蛋白的乳胶凝集试验或凝固酶玻片凝集试验		
	色素 CPG	观察菌落色素产生 (奶油色或金黄色)		

STAPH ID 可鉴定的菌种:

***Staphylococcus* spp.**

- S. aureus* subsp. *aureus* 金黄色葡萄球菌金黄色亚种
- S. aureus* subsp. *anaerobius* 金黄色葡萄球菌厌氧亚种
- S. auricularis* 耳葡萄球菌
- S. caprae* 山羊葡萄球菌
- S. capitis* subsp. *capitis* 头状葡萄球菌头状亚种
- S. capitis* subsp. *ureolyticus* 头状葡萄球菌解脲亚种
- S. conhii* subsp. *ureolyticum* 科氏葡萄球菌解脲亚种
- S. carnosus* 肉葡萄球菌
- S. chromogenes* 产色葡萄球菌
- S. conhii* subsp. *conhii* 科氏葡萄球菌科氏亚种
- S. epidermidis* 表皮葡萄球菌
- S. haemolyticus* 溶血葡萄球菌
- S. hominis* subsp. *hominis* 人葡萄球菌人亚种
- S. hominis* subsp. *novobiosepticus*
- S. hyicus* 猪葡萄球菌
- S. intermedius* 中间葡萄球菌
- S. lentus* 缓慢葡萄球菌
- S. lugdenensis* 路邓葡萄球菌
- S. saccharolyticus* 解糖葡萄球菌
- S. saprophyticus* 腐生葡萄球菌
- S. schleiferi* subsp. *Schleiferi* 施氏葡萄球菌施氏亚种
- S. schleiferi* subsp. *coagulans* 施氏葡萄球菌凝聚亚种
- S. sciuri* 赛氏葡萄球菌(松鼠葡萄球菌)
- S. simulans* 模仿葡萄球菌
- S. warneri* 沃氏葡萄球菌
- S. xylosus* 木糖葡萄球菌

***Kocuria* spp.**

- K. kristinae* 克科勒菌
- K. rosea* 玫瑰色库克菌
- K. carniphila*

***Kytococcus* spp.**

- Ky. sedentarius*

***Micrococcus* spp.**

- M. luteus* 藤黄微球菌
- M. lylae* 里拉微球菌

