

Instrucciones para uso de RoscozymTM

Revisión: DBV0015D
Fecha de publicación: 20.04.2007
Idioma: Español

RoscozymTM Kit para identificación de enterobacterias

Fabricante

ROSCO Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Dinamarca, www.rosco.dk

Uso previsto

Identificación *in vitro* de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores oxidasa negativos.

Fundamento

El kit Roscozym combina un total de 11 tests enzimáticos que utilizan 10 comprimidos con sustratos convencionales modificados y cromogénicos contenidos en 11 minitubos contiguos dispuestos en un panel (el tubo No. 11 no contiene tableta, pero puede ser utilizado para hacer un test suplementario). Las enzimas preformadas contenidas en la suspensión bacteriana reaccionan con los sustratos contenidos en los comprimidos y, después de una incubación durante 4 horas a 35-37°C, se puede leer los resultados de las pruebas, como reacciones de color (ya sea por adición de reactivos, o sin ellos). También es posible, sin riesgo de resultados erróneos, la lectura después de incubar hasta el día siguiente.

Instrucciones de conservación

En el momento de la recepción, almacene el envase externo en un frigorífico a 2-8°C.

La fecha de caducidad del panel es válida sólo en paneles Roscozym con tapas y almacenados a la temperatura prescrita.

Reactivos

El kit Roscozym incluye diez diferentes comprimidos que contienen cantidades de sustrato, determinadas con exactitud, dispuestos en un panel Roscozym que admite 11 tests para la detección de la actividad enzimática.¹

Precauciones

Respete las instrucciones de uso. La eficacia del kit Roscozym depende de la adecuada elección del inóculo y del tiempo de incubación, así como de la correcta interpretación del color después de la incubación. Los productos deberán ser manejados exclusivamente por técnicos que dispongan de la formación adecuada. Como precaución frente a los riesgos microbiológicos, se deberá esterilizar adecuadamente las muestras, los recipientes, los medios y el panel después de su uso. A la hora de eliminar los kits y las placas de agar con posibles patógenos, se los considera como residuos microbiológicos.

Muestras

Las muestras analizables mediante el sistema Roscozym serán únicamente bacilos Gram negativos oxidasa negativos. La toma de muestras y la manipulación de las mismas deben ser conformes con las directrices recomendadas. La muestra debe ser un cultivo puro, totalmente típico de la especie cuya identificación deseamos.

Procedimiento

Materiales suministrados: 20 paneles de Roscozym, Ficha de registro de Roscozym, Índice de Roscozym.

Materiales necesarios pero no suministrados: Medios de cultivo, Aminopeptidase reagent (Rosco, n° 92231), reactivo de Kovacs (Rosco, n° 92031), microorganismos para control de calidad y equipo de laboratorio necesario para efectuar la identificación (p. ej.: asas para inoculación, torundas, pipetas y recipientes colectores).

I. Instrucciones de uso

I.1. Preparación del inóculo

- Escoja colonias bien aisladas y morfológicamente idénticas de la placa primaria (agar McConkey, agar Drigalski, TSA o medio similar) y prepare una suspensión en 3 ml de suero fisiológico (NaCl al 0,9%) hasta conseguir una turbidez que sea igual (como menos) a la del patrón nº 2 de McFarland. Preferentemente, se usará agar McConkey o agar Drigalski.
- Utilice solamente cultivos recientes (18-24 horas).
- Efectúe un ensayo de pureza sembrando sobre una placa de agar no selectivo.

I.2. Inoculación e incubación

- Abra el panel y reparta la suspensión bacteriana en alícuotas de 0,25 ml entre los 10 tubos.
- Añada tres gotas de aceite de parafina estéril a los tubos nº 7 y nº 8 (LDC y ODC) y cierre el panel presionando firmemente la tapa sobre todos los tubos (las dos asas mirando hacia direcciones opuestas).
- Incube a 35-37°C durante 4 horas (o durante toda la noche), p. ej. utilizando una bandeja para kits.
- Cuando las pruebas de fermentación de azúcares (ADON, SORB, XYL) muestren resultados dudosos después de cuatro horas, se deberá efectuar una nueva incubación durante toda la noche y leer después.

I.3. Lectura

Se efectúa la interpretación de las reacciones (positiva/negativa) por comparación del color, con la “Ficha de registro de Roscozym” incluida en la caja.

- En primer lugar, lea la reacción espontánea de la ureasa (UR) (10) en el tubo nº 10 (comprimido de prueba doble UR/IN). Después de incubar durante 18-24 horas, solamente el violeta o el rojo fuerte son positivos.
- Abrir la mitad de la tapa flexible; vierta tres gotas del Aminopeptidase reagent (Rosco, nº 92231) al tubo nº 9 (PYR) y tres gotas del reactivo de Kovacs (Rosco, nº 92031) al tubo nº 10 (UR/IN); luego, cierre el panel. Agite suavemente durante 2-3 segundos.
- Anote todas las reacciones restantes: N^{os} 1-9 y reacción nº 11 (indol). Después de incubar durante 18-24, horas sólo el color violeta /azul fuerte es positivo para LDC y ODC.
- Si los reactivos se han añadido después de 4 horas, no será posible una nueva lectura de estas reacciones (n^{os} 9 y 11) posterior a la incubación durante toda una noche. A la hora de definir el *perfil numérico* después de una noche, utilice los resultados correspondientes a las cuatro horas (n^{os} 9, 10 y 11).

II. Resultados

- Las 11 pruebas están agrupadas de tres en tres más un grupo de 2 pruebas. Los resultados negativos quedan registrados como “0”; los positivos quedan como “1” en la primera prueba de cada grupo (ONPG, ADON, LDC y UR), como “2” en la segunda (PGUA, SORB, ODC e IN) y como “4” en la tercera (β -XYL, XYL y PYR) (véase la tabla de interpretación).
- Sumando los valores obtenidos en las pruebas (tres o dos) de cada uno de los cuatro grupos, se obtiene un número de cuatro cifras. Este número de cuatro cifras constituye el denominado *perfil numérico del microorganismo desconocido*.
- Registre y calcule el *perfil numérico del microorganismo desconocido* utilizando la “Ficha de registro de Roscozym”.

Ejemplo:

FICHA DE REGISTRO DE ROSCOZYM

Fecha:	Muestras										
Prueba	ONPG	PGUA	β -XYL	ADON	SORB	XYL	LDC	ODC	PYR	UR	IN
Valores de positivo	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Resultados	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
SUMA de positivos	3			6			3			2	
Código numérico:	3632			Identificación:							

Compare el perfil numérico resultante con los perfiles facilitados en el Índice Roscozym incluido en la caja.

Código numérico/Perfil numérico: 3632 **Identificación:** *E. coli*.

Resultados inesperados o no concluyentes:

Se recomienda repetir el ensayo, así como efectuar una prueba con cepas de CC. En algunos casos, puede ser útil recurrir a pruebas suplementarias o a una nueva muestra. Como alternativa, se puede enviar la cepa a un laboratorio de referencia para una identificación complementaria.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Para supervisar los resultados de Roscozym, se deberá aplicar un procedimiento de control de calidad con cepas ATCC u otras cepas positivas o negativas conocidas. Se deberá realizar el control de calidad de acuerdo con procedimientos de control de calidad de laboratorio reconocidos. Más abajo, figuran los resultados positivos/negativos correspondientes a cepas ATCC. Un código numérico correcto para las respectivas cepas ATCC confirma la conformidad en las características de todo el procedimiento.

Tabla de control de calidad

Valores de positivo	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	Código
Cepa ATCC	ONPG	PGUA	B-XYL	ADON	SORB	XYL	LDC	ODC	PYR	UR	IN	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	3632
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	5261
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0403

Si se observa algún resultado aberrante en el control calidad, se renunciará a notificar los resultados clínicos.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

- El método Roscozym deberá ser empleado sólo para diferenciar los distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En la base de datos, también están comprendidos los miembros oxidasa negativos del grupo de no fermentadores.
- Se deberá utilizar cultivos de microorganismos que sean puros, ya que una población microbiana mixta daría lugar a resultados aberrantes.
- Se debe tener en cuenta que la identificación bioquímica de *Salmonella* y *Shigella* constituye una prueba de presunción, que deberá quedar confirmada por un método serológico.
- En unos pocos casos, serán necesarias otras pruebas adicionales para completar la identificación (véase el Índice de Roscozym).
- El uso de Roscozym para la identificación de microorganismos y la interpretación de los resultados requiere la presencia de un técnico experto en métodos microbiológicos generales y que sepa manejar de forma razonable conocimientos, experiencia, información sobre muestras, así como otros procedimientos pertinentes antes de dictaminar la identidad del microorganismo aislado.
- Los resultados de ensayos adicionales pueden afectar al resultado de la identificación final.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Guía del usuario de Diatabs. www.rosco.dk
2. Brison et al. Interet taxonomique de la recherche de la beta-xylosidase chez les Enterobacteriaceae. Ann. Inst. Pasteur, **123**, 341-347, 1972.
3. Casals J.B., Pringler N. Rapid identification of Enterobacteriaceae using the ROSCOZYM 4-HOUR ENT kit", 2. Congress of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/European Society of Clinical Microbiology Symposium, May 1986, Mallorca (Spain).
4. Dibb W.L., Bottolfsen K.L. Evaluation of Rosco Diagnostic beta-glucuronidase Tablets in the identification of urinary isolates of *E. coli*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.B, **92**, 261-264, 1984.
5. Dominguez A et al. Use of a commercial double-test tablet (Rosco PGUA/Indole) for screening of *E. coli*. Diagn. Microbiol. infect. **15**, 291-294, 1992.
6. Godsey J.H. et al. Rapid identification of Enterobacteriaceae with microbial enzyme activity profiles. J. Clin. Microbiol., **13**, 483-490, 1980.
7. Hansen W., Yourassowsky E. Detection of beta-glucuronidase in lactose fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine cultures. J. Clin. Microbiol., **20**, 1177-1179, 1984.
8. Kilian M., Bülow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, **84**, 245-251, 1976.
9. Mulczyk M., Szewczuk A. Pyrrolidonyl aminopeptidase in bacteria: a new colorimetric test for differentiation of Enterobacteriaceae. J. Gen. Microbiol. **61**, 9-13, 1970.

Tabla de interpretación de Roscozym

Nº de prueba	Componente del reactivo (principios activos, en cada comprimido)	Código marcado en el panel	Reactivo	Valor	Reacción positiva	Reacción negativa
1	Beta-Galactosidase (o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido, 0,4 mg)	ONPG	-	1	Amarillo	Incoloro
2	Beta-Glucuronidase (ácido p-Nitrofenil- β -D glucurónico, 0,3 mg)	PGUA	-	2	Amarillo	Incoloro
3	Beta-Xylosidase (p-Nitrofenil β-D-xilopiranosido, 0,3 mg)	β-XYL	-	4	Amarillo	Incoloro
4	Adonitol (Adonitol, 3 mg)	ADON	-	1	Amarillo, naranja amarillento	Rojo, rojo anaranjado
5	Sorbitol (D-Sorbitol, 2 mg)	SORB	-	2	Amarillo, naranja amarillento	Rojo, rojo anaranjado
6	D-Xylose (D-xilosa, 2 mg)	XYL	-	4	Amarillo, naranja amarillento	Rojo, rojo anaranjado
7	Lysine Decarboxylase (LDC) (L-Lisina, 3 mg)	LDC	Aceite	1	Azul, violeta Violeta fuerte	Amarillo, verde, gris, azul claro
8	Ornithine Decarboxylase (ODC) (L-ornitina HCl, 3 mg)	ODC	Aceite	2	Azul, violeta Violeta fuerte	Amarillo, verde, gris, azul claro
9	Pyrrolidonyl Aminopeptidase (L-Pirrolidonil-β-naftilamida, 0,2 mg)	PYR	I	4	Rojo	Amarillo / naranja
10 *	Urease (Urea, 4 mg)	UR	-	1	Rojo / violeta	Amarillo / naranja
11 *	Indole (L-Triptófano, 1 mg)	IN	II	2	Rojo (capa superficial)	Amarillo / naranja

*) Pruebas nº 10 y 11, Urease/Indole: Se trata de un comprimido destinado a un análisis diagnóstico doble: permite efectuar dos pruebas en el mismo minitubo (un único comprimido).

Reactivos a añadir antes de la incubación:

Aceite: Vierta tres gotas de aceite de parafina antes de incubar.

Reactivos a añadir tras la incubación:

- I. Añada 3 gotas del Aminopeptidase reagent (Rosco, nº 92231) y lea la reacción de color en un plazo de 5 minutos.
- II. Añada 3 gotas del reactivo de Kovacs (Rosco, nº 92031), agite y observe el color de la capa superficial en un plazo de 3 minutos.