

## OXOID BIOCHEMICAL IDENTIFICATION SYSTEM - MONO

*A rapid colorimetric test for the differentiation of Listeria monocytogenes from other Listeria species.*

### Intended use

The Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) mono is a rapid colourimetric test for the determination of D-alanyl aminopeptidase (DALAase). It has been designed for the differentiation of presumptive *Listeria* species that have been isolated from selective media and plated on to a secondary medium for further biochemical testing.

### Principle of the test

The O.B.I.S. mono test offers a rapid screening method for differentiation of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. This reduces the need for full biochemical identification of all suspect colonies.

*Listeria* species, with the exception of *Listeria monocytogenes*, possess the enzyme D-alanyl aminopeptidase<sup>1,2,3</sup>.

Oxoid has developed a new system for aminopeptidase testing which uses a non-carcinogenic substrate. This is in response to health concerns associated with amino acid conjugates of  $\beta$ -naphthylamine<sup>4,5</sup> as these are potent carcinogens<sup>6</sup>.

D-alanyl-7-amido-4-methylcoumarin (DALA) is provided as a suspension. An acidic solution of dimethylaminocinnamaldehyde is used as a colour developer. If the substrate is hydrolysed by DALAase, free 7-amino-4-methylcoumarin (7AMC) combines with the developer to produce a purple Schiff's base<sup>7</sup>.

### Specimens

The test is designed for use from purity plates, not from primary isolation media, as the colonies on primary isolation media are too small to carry out an effective test.

Pick colonies which have typical *Listeria* morphology from selective *Listeria* isolation media such as Oxford Agar (CM0856), PALCAM Agar (CM0877) and chromogenic *Listeria* Media, and streak onto a purity plate.

O.B.I.S. mono tests can be performed from purity plates recommended by international standards, such as Tryptone Soya Agar (CM0131), Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSA-YE)<sup>8,9</sup> or a recognised chromogenic *Listeria* Medium<sup>8</sup>.

### Limitations of the test

O.B.I.S. mono is intended for the detection of DALAase in Gram-positive, catalase-positive, oxidase-negative short rod shaped bacteria, capable of growing on selective *Listeria* primary isolation media. It can be used as a screen to differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria*.

Occasionally aesculin positive *Bacillus* species may grow on *Listeria* isolation media. Bacilli are DALAase positive, but the colonies are different from *Listeria* and bacilli appear as large rods upon Gram staining.

Due to the small size of *Listeria* colonies on primary isolation media it is not possible to carry out the test directly from these plates. Use of multiple colonies from the primary isolation plate is not recommended as this may lead to a mixed culture and an incorrect result. International standards recommend sub-culturing presumptive *Listeria* species on to purity plates TSA (CM131), TSA-YE<sup>8,9</sup> or a recognised chromogenic *Listeria* Medium<sup>8</sup>.

Occasionally certain *Listeria* when grown on non-selective media form colonies that are difficult to remove with an inoculating loop. Ensure that there is sufficient colonial material on the inoculating loop before inoculating the reaction area. Failure to pick up sufficient material on the loop will result in a negative DALA test.

O.B.I.S. mono provides presumptive identification of *Listeria monocytogenes*, but does not replace full biochemical testing.

### References

1. Kämpfer, P., Böttcher, S., Dott, W., Rüdén, H. (1991) Physiological characterization and identification of

*Listeria* species. *Zentralblatt für Bakteriologie* 275, 423-435.

2. Kämpfer, P. (1992) Differentiation of *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., and related organisms by fluorogenic substrates. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1067-1071.
3. Clark, A.G., McLauchlin, J. (1997) Simple color tests based on an alanine aminopeptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2155-2156.
4. Morgan, J. W. (1987) Evaluation of a rapid method for the determination of L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide hydrolysis. *Laboratory Medicine* 18, 682-683.
5. Bascomb, S. and Manafi, M. (1998) Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 318-340.
6. Anonymous (2000) 2-naphthylamine. In Croner's *Hazardous substances: carcinogens guide*. pp. 2-291. Kingston-upon-Thames: Croner.CCH Group Limited.
7. Druggan, P., Roberts, P.B. and Swaine, D. (1999) A rapid chromogenic method for the differentiation of *Citrobacter* spp. and *Salmonella* spp. directly from enteric media. Abstract of the annual meeting of the American Society for Microbiology 1999, C444, p.71. Washington: ASM Press.
8. International Standards Organisation (1996) ISO 11290-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - part 1: detection method*. London: British Standards Institute.
9. FDA (1998) Appendix 3: Trypticase Soy Agar with 0.6% Yeast Extract (TSAYE). In *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, revision A* ed. Jackson, G. J. pp. 54-55. Gaithersburg: AOAC International.

## OXOID BIOCHEMICAL IDENTIFICATION SYSTEM - PYR

*The Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) - PYR is a rapid colorimetric test for the determination of PYRase activity in streptococci and Citrobacter spp.*

### Principle of the test

PYRase activity distinguishes Group A *streptococci* and *enterococci* from other streptococcal groups including Group D *streptococci* (previously called faecal *streptococci*)<sup>1,2</sup>, Thus offering a rapid diagnostic alternative to time-consuming culture methods. In addition, the same enzymatic activity may be used to aid differentiation of *Salmonella* spp. from *Citrobacter* spp. and other *Enterobacteriaceae*<sup>3,4</sup>.

The PYRase test has traditionally been based on the use of a  $\beta$ -naphthylamide peptide. This is a potent carcinogen<sup>5</sup>. Oxoid has developed a new system using a non-carcinogenic substrate, in response to associated health concerns.

The O.B.I.S. - PYR test uses Test Cards impregnated with L-pyrroglutamic acid 7-amino-4-methyl-coumarin (7AMC) and dimethylamino-cinnamaldehyde for the detection of PYRase activity. The enzymatic hydrolysis of this substrate by enterococci, Group A *streptococci* and *Citrobacter* spp. produces a purple colour following the addition of the Developing Solution<sup>6</sup>.

### Specimens

For details of specimen collection and treatment a standard text book should be consulted<sup>7</sup>.

When identifying enterococci and Group A *streptococci*, fresh primary or secondary cultures grown overnight on non selective media such as blood agar give best results. Colonies tested must be Gram-positive cocci and catalase-negative. In case of insufficient growth, a subculture should be performed.

When identifying *Citrobacter* spp. from *Salmonella* spp. and *Enterobacteriaceae*, colonies from non-selective media such as XLD Medium, MLCB Agar, Desoxycholate Citrate Agar, Salmonella Shigella Agar, Brilliant Green Agar or Hektoen Enteric Agar may be tested. Colonies should be Gram-negative, oxidase-negative and urease-negative<sup>7</sup>.

## Expected results

Organism	Lancefield group	O.B.I.S. PYR
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	-
<i>Streptococcus</i> Group C	C	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	D	+
<i>Enterococcus faecium</i>	D	+
<i>Streptococcus</i> Group F	F	-
<i>Streptococcus</i> Group G	G	-
<i>Citrobacter</i>	-	+
<i>Salmonellae</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-

### Limitations of the test

O.B.I.S.-PYR is intended for the detection of PYRase activity in Gram-positive, catalase negative cocci and *Citrobacter* spp. Less commonly encountered isolates of *lactococci* and *aerococci* may be PYRase positive. The confirmation of *enterococci* or Group A *streptococci* can be achieved by serological grouping with a suitable test, e.g. Oxoid Streptococcal Grouping Kit (DR 595), Oxoid Strep Plus (DR 575) or Oxoid Dryspot Streptococcal Grouping Kit (DR 400).

Some strains of *Enterobacter cloacae* are PYRase negative.

The reactions with O.B.I.S. - PYR are a marker for enzyme activity and atypical strains may occasionally occur.

A slight colour change may develop with negative reactions. This is restricted to the immediate site of inoculation. Refer to the positive and negative controls to aid interpretation.

Incubation beyond 20 seconds following addition of the Developing Solution may produce non-specific colour reactions. It is important therefore that the test is read as indicated.

### References

1. Ellener, P.D., Williams, D. A., Hosmer, M. E. and Cohenford, M. (1985). Preliminary evaluation of rapid colorimetric method for the presumptive identification of Group A *streptococci* and *enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* **22**. 880-881.
2. Facklam, R. R., Padula, J. F., Thacker, L. G., Wortham, E. C. and Sconyers, B. J. (1974). Presumptive identification of Group A, B and D *streptococci*. *Appl. Microbiol.* **27**. 107-109
3. Chagla, A. H., Borczyk, A. A., Aldom, J. E., Dalla Rosa, S. and Cole, D. D. (1993). Evaluation of the L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide hydrolysis test for differentiation of members of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **31**. 1946-1948.
4. Bennett, A. R., MacPhee, S., Betts, R. and Post, D. (1999). Use of enzyme pyrrolidonyl peptidase (Oxoid PYR test) to distinguish *Citrobacter* from *Salmonella* isolated from foods. *Letters in Applied Microbiology.* **28**. 175-178.
5. Bascomb, S. and Manafi, M. (1998). Use of enzyme tests in the characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Clinical Microbiological Reviews.* **11**. 318-340.
6. Data on file at Oxoid.
7. Faklam, R. R. and Washing, J. A. (1991). *Streptococci* and *aerococci* pp. 238-258, In Lunette, I. H. Balles, A., Hausler (Jr), W. J. and Shadomy, H. J. (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 5<sup>th</sup> edition. Amer. Soc. For Microb., Washington D.C.

## OBIS TEST FOR *Salmonella* DIFFERENTIATION FROM SELECTIVE MEDIA

OBIS Salmonella from Oxoid Limited is a simple, five-minute test used to differentiate *Salmonella* species from micro-organisms of similar colonial appearance grown on selective culture media.

This rapid chromogenic test quickly and reliably identifies false positive colonies such as *Citrobacter*, *Proteus* and *Morganella* species, providing a negative result within 5 minutes and considerably reducing the number of samples to require further lengthy testing for identification purposes. OBIS Salmonella thus eliminates potentially positive results more quickly, resulting in faster sample turnaround and more effective use of resources.

*Salmonella* presents a particular problem in food testing regimes since other non-pathogenic micro-organisms commonly found in food, such as *Citrobacter*, *Proteus* and *Morganella* species, may present with similar morphology on standard diagnostic culture media. Such presumptive positive colonies must then be further tested to eliminate or confirm the presence of *Salmonella*. Traditionally, this relies on expensive biochemical and serological tests and can take up to 24 hours to obtain a result.

In the meantime, until a negative result is obtained, the release of the product is delayed, production may be suspended and often the plant may be cleaned down as a precaution, resulting in considerable cost and concern for the manufacturer.

In the majority of cases it is sufficient to confirm that suspect colonies are NOT *Salmonella*, without identifying the species. It was in recognising this potential that Oxoid Limited developed OBIS Salmonella (OBIS: Oxoid Biochemical Identification System).

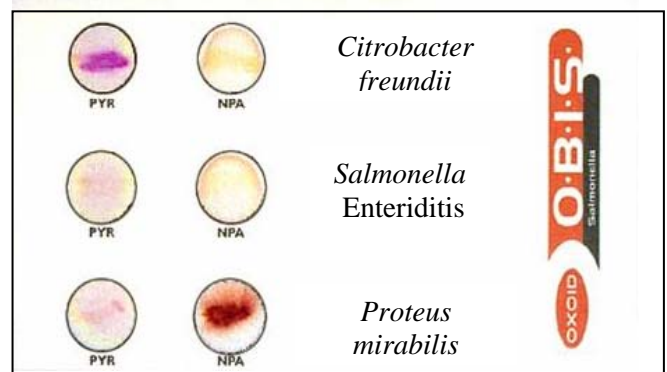
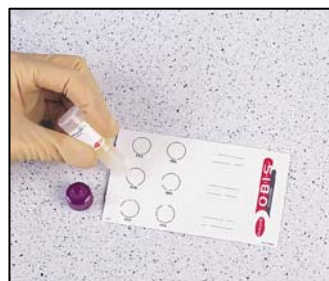
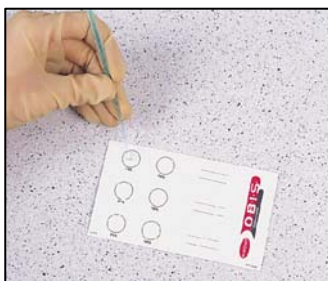
OBIS Salmonella incorporates two simple biochemical reactions on a single disposable test card. The first, PYR, detects PYRase activity in *Citrobacter* species and the second, NPA, demonstrates deaminase activity in *Proteus* and *Morganella* species (see illustration). Positive activity is demonstrated by a vivid colour reaction (PYR - purple, NPA - orange), indicating the presence of non-*Salmonella* species. Colonies that test negative for both reactions are confirmed as presumptive *Salmonella*.

By confirming that suspect colonies are not *Salmonella* in just 5 minutes, OBIS Salmonella allows batches to be released and production to continue up to 24 hours earlier than by traditional methods. Furthermore, fewer API tests (to identify *Salmonella*) are required, saving time and resources in the laboratory.

In trials involving 1000 samples grown on a variety of selective culture media, 470 produced presumptive positive *Salmonella* colonies. Of these OBIS Salmonella screened out 406 false positives, reducing the number of presumptive positive plates requiring further testing to 64. All positive *Salmonella* samples were detected (ref1).

### References:

1. Coleman, D.J., Barnwell, A.P. and Raggett, J. Birmingham PHLS West Midlands, Poster Presentation, Oxoid Limited.



## SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA OXOID (O.B.I.S.) CAMPY

### Uso previsto

El sistema de identificación bioquímica Oxoid (O.B.I.S.) es una prueba colorimétrica rápida y simple para la detección de L-alanil aminopeptidasa. Se ha diseñado para la diferenciación entre especies de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* de otros microorganismos gramnegativos e incorpora una prueba de lisis-Gram que demostrará el "status" del Gram.

### Principio de la prueba

La prueba O.B.I.S. Campy diferenciará las especies de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* respecto a todos los demás microorganismos gramnegativos<sup>(1)</sup>. A diferencia de otros microorganismos gramnegativos, *Campylobacteraceae* no posee la enzima L-alanil aminopeptidasa (L-ALA). La prueba O.B.I.S. Campy incorpora una prueba rápida para detectar esta enzima y un reactivo de lisis de Gram para determinar rápidamente el estado de Gram.

Primero, debe realizarse la prueba de lisis de Gram (o una tinción de Gram). Esta prueba diferencia entre las bacterias grampositivas y gramnegativas<sup>(2)</sup>. La prueba se realiza en un portaobjetos de vidrio. Se utiliza hidróxido sódico (0,5 M) para romper la pared celular de los microorganismos gramnegativos y liberar el DNA. El DNA forma una especie de filamento que puede verse cuando se separa el asa de la superficie del portaobjetos. Esta reacción no se produce con los microorganismos grampositivos.

Una vez identificado el microorganismo como gramnegativo, puede realizarse la prueba L-ALA.

Cada tarjeta de reacción O.B.I.S. ha sido impregnada con el sustrato de L-ALA (L-alanil-7-amino-4-metilcumarina) en cada una de las seis zonas de reacción. Se usa una solución ácida de dimetilaminocinamaldehído (DMAC) como revelador de color. Si el sustrato ha sido hidrolizado por el microorganismo, la 7-amino-4-metilcumarina libre se combinará con el revelador para producir una base de Schiff de color púrpura.

### Muestras

La prueba está diseñada para uso a partir de placas de resiembra como agar sangre Columbia No deben usarse medios de aislamiento primarios porque las colonias pueden ser muy pequeñas o demasiado escasas para realizar una prueba eficaz. Elija las colonias que tienen una morfología típica de *Campylobacter* de medios de aislamiento selectivo de *Campylobacter* y siémbrelas en el agar sangre Columbia. Incube en una atmósfera microaerobia durante 48 horas y luego realice la prueba O.B.I.S.

### Procedimiento de prueba e interpretación de los resultados

#### Prueba de lisis de Gram

1. Tome un asa llena de 10 µl de solución de hidróxido sódico 0,5 M (frasco de tapa blanca plana) y póngalo en un portaobjetos de vidrio limpio.
2. Usando un asa estéril, tome una pequeña cantidad de material de una placa de resiembra.
3. Mezcle la muestra en el OHNa en el portaobjetos durante un minuto como máximo.
4. A intervalos, eleve cuidadosamente el asa de la mezcla para comprobar la presencia de una especie de filamento entre el asa y la mezcla.
5. Registre el resultado:
  - Un resultado positivo se caracteriza por un aspecto viscoso en la mezcla y la presencia del filamento de DNA. Esto indica que el microorganismo es **gramnegativo**.
  - Un resultado negativo se caracteriza por la formación de una suspensión celular sin filamento e indica que el microorganismo es **grampositivo**.

Esta prueba puede realizarse también usando una solución de hidróxido potásico (OHK) 0,5 M. De forma alternativa, puede usarse una tinción de Gram tradicional para comprobar el estado de Gram del microorganismo.

#### Prueba L-ALA

Una vez identificado el microorganismo como gramnegativo, puede realizarse la parte de L-ALA de la prueba.

1. Extraiga una de las tarjetas de prueba de la bolsa.

- Usando el extremo de pala de una "pastette" de plástico no usada, transfiera el equivalente de colonias de 5 x 1 mm de una placa de resiembra al área de prueba.
- Extienda la muestra a través de la zona de reacción (dentro de un círculo) de una tarjeta de prueba.
- Dispense una gota de tampón O.B.I.S. Campy (frasco gotero de tapa blanca) en cada una de las zonas de reacción inoculadas.
- Espere 30 segundos.
- Dispense una gota de revelador O.B.I.S. DMAC (tapa púrpura) en cada una de las zonas de reacción inoculadas.
- La aparición de un color púrpura alrededor del material de colonia original en 20 segundos es una reacción L-ALA positiva. Una reacción positiva indica que el microorganismo **no** es una especie de *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.  
Si no se desarrolla color alrededor del material de colonia original en 20 segundos, se trata de una reacción negativa. Una reacción negativa indica que el microorganismo es una presunta especie de *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.

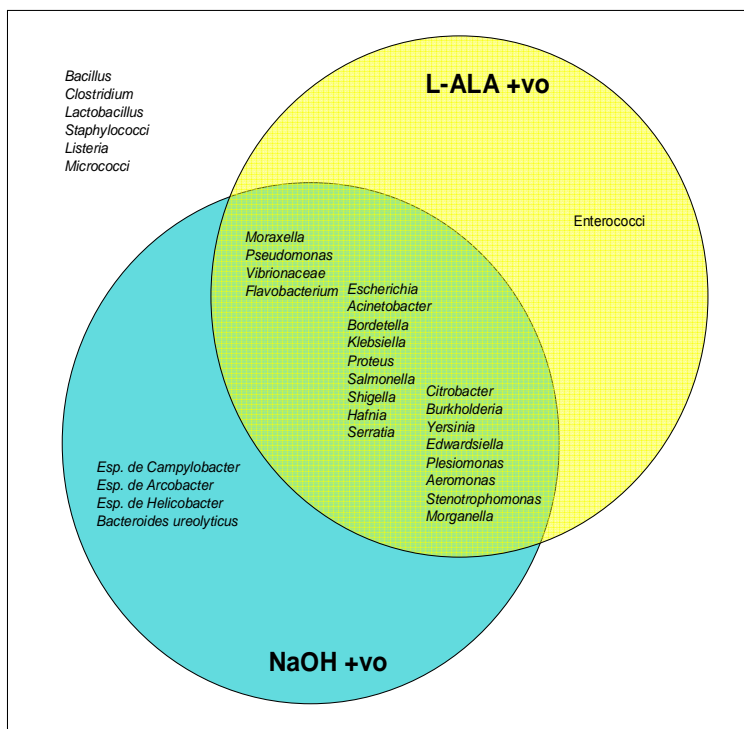
### Tabla de interpretación

Reacciones típicas:

Microorganismo	OHNa 0,5 M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (ejem, gramneg.)	-
Grampositivos	- (ejem, grampos.)	-
Otros gramnegativos	+ (ejem, gramneg.)	+

### Diagrama de Venn

El diagrama de Venn demuestra cómo pueden diferenciarse *Campylobacter* y microorganismos relacionados con *Campylobacter* de otras bacterias comunes usando la lisis Gram y las pruebas de L-ALA de O.B.I.S. Campy.



### Limitaciones de la prueba

O.B.I.S. Campy está pensado para la detección de L-alanil aminopeptidasa en microorganismos gramnegativos. Puede usarse para la identificación de presunción de *Campylobacter* y microorganismos relacionados a partir de cultivos puros.

La reacción con la prueba de L-ALA del O.B.I.S. es un marcador de actividad enzimática y ocasionalmente pueden producirse cepas atípicas. *Bacteroides ureolyticus* puede dar las mismas reacciones que las

especies de *Campylobacter*. Sin embargo, la morfología de sus colonias y la anaerobiosis ayudan en la diferenciación.

Con el tiempo, el revelador DMAC puede dar una reacción ligeramente rosa con el tampón Campy incluso en negativos. Sin embargo, esto se diferencia fácilmente de la reacción claramente púrpura que se ve alrededor del material de colonia en un positivo.

No use asas de alambre de níquelcromo para inocular las tarjetas, porque este material puede interferir con la prueba.

### **Rendimiento**

En un estudio interno, se estudiaron 46 especies de *Campylobacter* y 6 especies de *Arcobacter*. Todas dieron reacción gramnegativa, L-ALA negativa. Se estudiaron otras 252 especies (no-*Campylobacter*, *Arcobacter* ni *Helicobacter*). Sólo un microorganismo dio un resultado similar a *Campylobacter* y se debió a una reacción de lisis Gram atípica. Esto dio como resultado una sensibilidad y una especificidad del 100% y el 99,6% respectivamente<sup>(3)</sup>.

### **Bibliografía**

1. Hoosain, N. and Lastovica A.J. (2005). Evaluation of the Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) for the differentiation of *Campylobacter* and *Arcobacter* from other Gram-negative organisms. In: Abstracts of CHRO 2005. 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Sept 4-8, 2005, Gold Coast, Queensland, Australia. Griffith University.
2. Carlone, G.M., Valadez, M.J. and Pickett, M.J. (1982) Methods for distinguishing Gram-positive from Gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 16 (6), 1157-1159.
3. Smith, C.M., Colborne, N.R., Stephens, P.J. and Druggan, P. (2006) A simple and rapid biochemical screening test for the differentiation of *Campylobacter* spp. from other contaminating micro-organisms. In: Abstracts of Emerging *Campylobacter* spp. in the food chain, CAMPYCHECK. Feb 8<sup>th</sup> 2006, Croke Park Conference Centre, Dublin, Ireland.

**APPROVED**

*By vzkmae at 4:57 pm, Apr 24, 2007*

ID0800M







# **OXOID BIOCHEMICAL IDENTIFICATION SYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY**

## **Intended Use**

The Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) campy is a simple rapid colorimetric test for the detection of L-alanyl aminopeptidase. It has been designed for the differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Arcobacter* species from other Gram-negative organisms and incorporates a Gram-lysis test which will demonstrate Gram status.

## **Principle of the Test**

The O.B.I.S. campy test will differentiate species of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Arcobacter* from all other Gram-negative organisms<sup>1</sup>. Unlike other Gram-negative organisms, *Campylobacteraceae* do not possess the enzyme L-alanyl aminopeptidase (L-ALA). The O.B.I.S. campy test incorporates a rapid test to detect this enzyme and a Gram-lysis reagent to rapidly determine the Gram status.

First, the Gram-lysis test (or a Gram stain) must be carried out. This test differentiates between Gram-positive and Gram-negative bacteria<sup>2</sup>. The test is carried out on a glass slide. Sodium Hydroxide (0.5M) is used to lyse the cell wall of Gram-negative organisms and release the DNA. The DNA forms a 'string' which can be seen when the loop is raised from the surface of the slide. This reaction does not occur with Gram-positive organisms.

Once the organism has been identified as Gram-negative, the L-ALA test can be carried out.

Each O.B.I.S. reaction card has been impregnated with the L-ALA substrate (L-alanyl-7-amino-4-methylcoumarin) in each of the six reaction zones. An acidic solution of dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) is used as a colour developer. If the substrate has been hydrolysed by the organism, the free 7-amino-4-methylcoumarin will combine with the developer to produce a purple Schiff's base.

## **Components of the O.B.I.S. campy Kit (ID0800M)**

Each kit contains the following reagents with enough material for 60 tests:

- ID0803M** O.B.I.S. campy Test Cards – one resealable pouch containing 10 cards, each with six reaction zones.
- ID0804M** O.B.I.S. campy Buffer – one white capped dropper bottle containing 7 ml of solution.
- ID0221M** O.B.I.S. DMAC Developer – one purple capped dropper bottle containing 7 ml of 0.5% w/v dimethylaminocinnamaldehyde in 1M hydrochloric acid.
- ID0802M** 0.5M Sodium Hydroxide – one flat white capped bottle containing 6 ml of 0.5M NaOH (sufficient for 600 Gram-lysis screening tests).
- ID0898** Paddle pastettes – pack of 60.  
Instruction leaflet.

## Materials required but not included

Clean glass slides.  
Sterile 10 µl plastic disposable inoculating loops.  
Positive and negative quality control organisms.  
Scissors

## Precautions

This product is for *in vitro* diagnostic use only.

Do not use the O.B.I.S. campy reagents beyond the stated expiry date.

The DMAC Developer contains a weak acid and will stain the skin. The 0.5M Sodium Hydroxide Solution is corrosive and may cause burns. Do not breathe fumes/vapour. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. After contact with skin, wash immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

Used Test Cards and inoculating loops should be disposed of as biohazardous waste. This should be incinerated or autoclaved at 121°C for at least 15 minutes.

*Campylobacter* are pathogens. A low infective dose can cause gastro-enteritis with potentially serious complications. Take appropriate precautions when handling potentially contaminated samples.

## Storage and Opening

The O.B.I.S. campy kit must be stored at 2°C to 8°C. Allow the pouches to reach room temperature before use to prevent condensation forming on the Test Cards. Open the pouches by cutting at the notch between the end seal and the clip-lock opening.

Remove the number of Test Cards required and reseal the pouch. Use within 60 minutes.

If fewer tests are required than the number on the Test Card, cut the card and return the unused portion to the pouch. Do not return used Test Cards to the pouch.

Precipitation will occur after long-term storage of the Sodium Hydroxide – this does not affect performance. A sterile loop should always be used. Discard if there is any sign of contamination.

## Quality Control Procedure

The following procedure should be performed each time the kit is used:

### Gram-lysis Test

1. **Positive Control** – Use a known Gram-negative (Gram-lysis positive) organism, such as *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Follow the method given in the test procedure.
2. **Negative Control** – Use a known Gram-positive (Gram-lysis negative) organism such as *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Follow the method given in the test procedure.

## L-ALA Test

1. **Positive Control** – use a known L-ALA positive organism, such as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Follow the method given in the test procedure. Ensure that a purple colour forms around the colony material within 20 seconds.
2. **Negative Control** – Use a known L-ALA negative organism such as *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Follow the method given in the test procedure. Ensure that no purple colour forms within 20 seconds.

## Specimens

The test is designed for use from purity plates such as Columbia Blood Agar. Primary isolation media should not be used as the colonies may be too small or too few to carry out an effective test. Pick colonies which have typical *Campylobacter* morphology from selective *Campylobacter* isolation media and streak onto Columbia Blood Agar. Incubate in a microaerobic atmosphere for 48 hours then conduct the O.B.I.S. test.

## Test Procedure and Interpretation of Results

### Gram-lysis Test

1. Take a 10 µl loopful of 0.5M Sodium Hydroxide solution (white flat-capped bottle) and place onto a clean, glass slide.
2. Using a sterile loop, take a small amount of material from a purity plate.
3. Mix the sample into the NaOH on the slide for up to one minute.
4. At intervals, carefully raise the loop from the mixture to check for the presence of a 'string' between the loop and the mixture.
5. Record the result:
  - A positive result is characterised by a viscous appearance to the mixture and the presence of the DNA string. This indicates that the organism is **Gram-negative**.
  - A negative result is characterised by the formation of a cell suspension with no string and indicates that the organism is **Gram-positive**.

This test may also be carried out using a 0.5M potassium hydroxide (KOH) solution. Alternatively, a traditional Gram stain may be used to ascertain the Gram status of the organism.

## L-ALA Test

Once the organism has been identified as Gram-negative, the L-ALA portion of the test can be carried out.

1. Remove one of the Test Cards from the pouch.
2. Using the paddle end of an unused plastic pastette, transfer the equivalent of 5x1 mm diameter colonies from a purity plate to the test area.
3. Spread the sample across the reaction zone (inside a circle) of a Test Card.
4. Dispense one drop of O.B.I.S. campy buffer (white capped dropper bottle) onto each of the inoculated reaction zones.

5. Wait for 30 seconds.
6. Dispense one drop of O.B.I.S. DMAC Developer (purple cap) onto each of the inoculated reaction zones.
7. The appearance of a purple colour around the original colony material within 20 seconds is a positive L-ALA reaction. A positive reaction indicates the organism is **not** a *Campylobacter*, *Helicobacter* or *Arcobacter* species.

If no colour develops around the original colony material within 20 seconds this is a negative reaction. A negative reaction indicates the organism is a presumptive *Campylobacter*, *Helicobacter* or *Arcobacter* species.

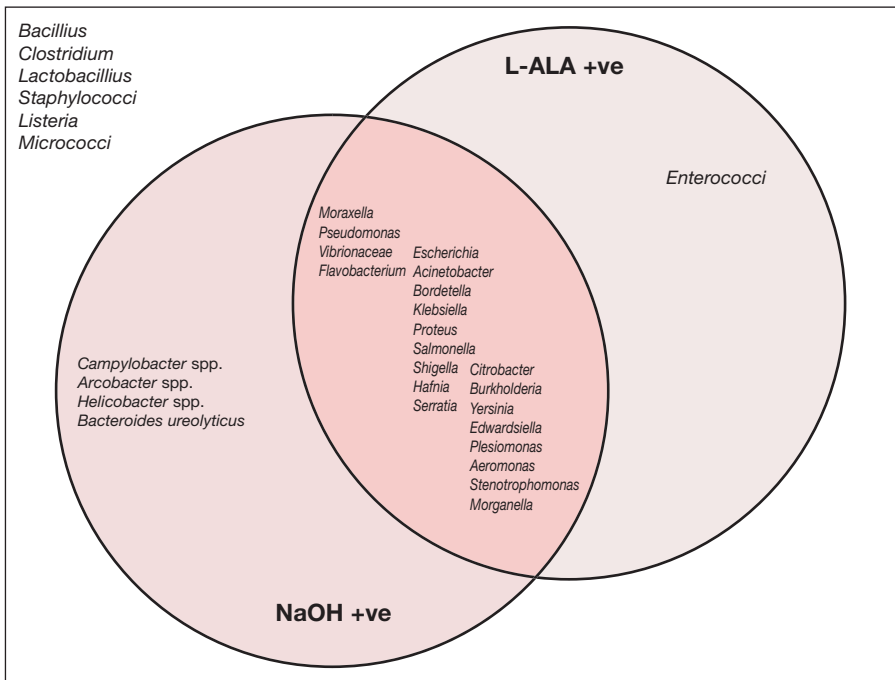
### Interpretation Chart

Typical reactions:

Organism	0.5M NaOH	L-ALA
<i>Campylobacteraceae</i>	+ (i.e. Gram neg)	-
Gram-positives	- (i.e. Gram pos)	-
Other Gram-negatives	+ (i.e. Gram neg)	+

### Venn Diagram

The Venn Diagram demonstrates how *Campylobacter* and *Campylobacter*-related organisms can be differentiated from other common bacteria using the Gram-lysis and L-ALA tests of O.B.I.S. campy.



## Limitations of the Test

O.B.I.S campy is intended for the detection of L-alanyl aminopeptidase in Gram-negative organisms. It can be used for the presumptive identification of *Campylobacter* and related organisms from pure culture.

The reaction with the O.B.I.S. campy L-ALA test is a marker for enzyme activity and atypical strains may occasionally occur. *Bacteroides ureolyticus* can give the same reactions as *Campylobacter* species. However, their colonial morphology and anaerobiosis aid differentiation.

Over time, the DMAC Developer may give a slightly pink reaction with the campy buffer even in negatives. However, this is easily differentiated from the clearly purple reaction seen around the colony material in a positive.

Do not use nichrome wire loops to inoculate cards as this material can interfere with the test.

## Performance

In an internal study, 46 *Campylobacter* species and 6 *Arcobacter* species were tested. All yielded a Gram-negative, L-ALA negative reaction. 252 other species (non-*Campylobacter*, *Arcobacter* or *Helicobacter*) were tested. Only one organism gave a result similar to *Campylobacter*, and was due to an atypical Gram-lysis reaction. This resulted in a sensitivity and specificity of 100% and 99.6% respectively<sup>3</sup>.

# SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA OXOID (O.B.I.S.) CAMPY

## Uso previsto

El sistema de identificación bioquímica Oxoid (O.B.I.S.) es una prueba colorimétrica rápida y simple para la detección de L-alanil aminopeptidasa. Se ha diseñado para la diferenciación entre especies de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* de otros microorganismos gramnegativos e incorpora una prueba de lisis-Gram que demostrará el 'status' del Gram.

## Principio de la prueba

La prueba O.B.I.S. Campy diferenciará las especies de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* respecto a todos los demás microorganismos gramnegativos<sup>1</sup>. A diferencia de otros microorganismos gramnegativos, *Campylobacteraceae* no posee la enzima L-alanil aminopeptidasa (L-ALA). La prueba O.B.I.S. Campy incorpora una prueba rápida para detectar esta enzima y un reactivo de lisis de Gram para determinar rápidamente el estado de Gram.

Primero, debe realizarse la prueba de lisis de Gram (o una tinción de Gram). Esta prueba diferencia entre las bacterias grampositivas y gramnegativas<sup>2</sup>. La prueba se realiza en un portaobjetos de vidrio. Se utiliza hidróxido sódico (0,5M) para romper la pared celular de los microorganismos gramnegativos y liberar el DNA. El DNA forma una especie de filamento que puede verse cuando se separa el asa de la superficie del portaobjetos. Esta reacción no se produce con los microorganismos grampositivos.

Una vez identificado el microorganismo como gramnegativo, puede realizarse la prueba L-ALA.

Cada tarjeta de reacción O.B.I.S. ha sido impregnada con el sustrato de L-ALA (L-alanil-7-amino-4-metilcumarina) en cada una de las seis zonas de reacción. Se usa una solución ácida de dimetilaminocinamaldehído (DMAC) como revelador de color. Si el sustrato ha sido hidrolizado por el microorganismo, la 7-amino-4-metilcumarina libre se combinará con el revelador para producir una base de Schiff de color púrpura.

## Componentes del kit O.B.I.S. Campy (ID0800M)

Cada kit contiene los siguientes reactivos con material suficiente para 60 pruebas:

- ID0803M** Tarjetas de prueba O.B.I.S. Campy – una bolsa resellable con 10 tarjetas, cada una con seis zonas de reacción.
- ID0804M** Tampón O.B.I.S. Campy – un frasco gotero de tapa blanca con 7 ml de solución.
- ID0221M** Revelador O.B.I.S. DMAC – un frasco gotero de tapa púrpura con 7 ml de dimetilaminocinamaldehído al 0,5% p/v en ácido clorhídrico 1M.
- ID0802M** Hidróxido sódico 0,5M – un frasco de tapa plana blanca con 6 ml de NaOH 0,5M (suficiente para 600 pruebas de cribado de lisis de Gram).

**ID0898** Pipetas de tipo pastettes® de pala – paquete de 60.  
Folleto de instrucciones.

### **Materiales necesarios que no se incluyen**

Portaobjetos de vidrio limpios  
Asas de inoculación desechables de plástico estériles de 10 µl  
Microorganismos de control de calidad positivos y negativos  
Tijeras

### **Precauciones**

Este producto es exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.  
No use los reactivos de O.B.I.S. Campy pasada la fecha de caducidad indicada.  
El revelador DMAC contiene un ácido débil y manchará la piel. La solución de hidróxido sódico 0,5 M es corrosiva y puede producir quemaduras.  
No respire humos/vapor. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto con los ojos, aclare inmediatamente con mucho agua y pida ayuda médica. Después de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con mucho agua y busque ayuda médica. Use indumentaria protectora adecuada y guantes protectores. Use protección para los ojos/la cara.  
Las Tarjetas de Prueba y las asas de inoculación usados deben eliminarse como residuos peligrosos. Deben incinerarse o someterse a autoclave a 121°C durante al menos 15 minutos.  
Los *Campylobacter* son patógenos. Una dosis infecciosa baja puede producir gastroenteritis con complicaciones potencialmente graves. Tome precauciones adecuadas cuando manipule muestras potencialmente contaminadas.

### **Conservación y apertura**

El kit O.B.I.S. Campy debe conservarse a 2°C a 8°C. Deje que las bolsas se pongan a temperatura ambiente antes de usarlas, para prevenir que se forme condensación en las Tarjetas de Prueba.  
Abra las bolsas cortando en la escotadura entre el sello final y la abertura cerrada con clip.  
Extraiga el número de tarjetas de prueba necesarias y vuelva a cerrar la bolsa. Úselas en el plazo de 60 minutos.  
Si se necesitan menos pruebas que la cantidad en la Tarjeta de prueba, corte la tarjeta y vuelva a meter la porción no usada en la bolsa. No vuelva a meter tarjetas de prueba usadas en la bolsa.  
Se producirá precipitación después de la conservación a largo plazo del hidróxido sódico – ésto no afecta a su rendimiento. Debe usarse siempre un asa estéril. Deséchelo si tiene contaminación obvia.

### **Procedimiento de control de calidad**

Debe realizarse el siguiente procedimiento cada vez que se use el kit:



## Prueba de lisis de Gram

1. **Control positivo** – Use un microorganismo Gramnegativo conocido (con lisis de Gram positiva) como *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Siga el método indicado en el procedimiento de prueba.
2. **Control negativo** – Use un microorganismo Grampositivo conocido (con lisis de Gram negativa) como *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Siga el método indicado en el procedimiento de prueba.

## Prueba L-ALA

1. **Control positivo** – Use un microorganismo L-ALA positivo conocido como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Siga el método indicado en el procedimiento de prueba. Compruebe que se forma un color púrpura alrededor del material de la colonia en 20 segundos.
2. **Control negativo** – Use un microorganismo L-ALA negativo conocido como *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Siga el método indicado en el procedimiento de prueba. Compruebe que no se forma un color púrpura en 20 segundos.

## Muestras

La prueba está diseñada para uso a partir de placas de resiembra como agar sangre Columbia No deben usarse medios de aislamiento primarios porque las colonias pueden ser muy pequeñas o demasiado escasas para realizar una prueba eficaz. Elija las colonias que tienen una morfología típica de *Campylobacter* de medios de aislamiento selectivo de *Campylobacter* y siémbrelas en el agar sangre Columbia. Incube en una atmósfera microaerobia durante 48 horas y luego realice la prueba O.B.I.S.

## Procedimiento de prueba e interpretación de los resultados

### Prueba de lisis de Gram

1. Tome un asa llena de 10 µl de solución de hidróxido sódico 0,5M (frasco de tapa blanca plana) y póngalo en un portaobjetos de vidrio limpio.
2. Usando un asa estéril, tome una pequeña cantidad de material de una placa de resiembra.
3. Mezcle la muestra en el OHNa en el portaobjetos durante un minuto como máximo.
4. A intervalos, eleve cuidadosamente el asa de la mezcla para comprobar la presencia de una especie de filamento entre el asa y la mezcla.
5. Registre el resultado:
  - Un resultado positivo se caracteriza por un aspecto viscoso en la mezcla y la presencia del filamento de DNA. Esto indica que el microorganismo es **gramnegativo**.
  - Un resultado negativo se caracteriza por la formación de una suspensión celular sin filamento e indica que el microorganismo es **grampositivo**.

Esta prueba puede realizarse también usando una solución de hidróxido potásico (OHK) 0,5M. De forma alternativa, puede usarse una tinción de Gram tradicional para comprobar el estado de Gram del microorganismo.

## Prueba L-ALA

Una vez identificado el microorganismo como gramnegativo, puede realizarse la parte de L-ALA de la prueba.

1. Extraiga una de las tarjetas de prueba de la bolsa.
2. Usando el extremo de pala de una 'pastette' de plástico no usada, transfiera el equivalente de colonias de 5x1 mm de una placa de resiembra al área de prueba.
3. Extienda la muestra a través de la zona de reacción (dentro de un círculo) de una tarjeta de prueba.
4. Dispense una gota de tampón O.B.I.S. Campy (frasco gotero de tapa blanca) en cada una de las zonas de reacción inoculadas.
5. Espere 30 segundos.
6. Dispense una gota de revelador O.B.I.S. DMAC (tapa púrpura) en cada una de las zonas de reacción inoculadas.
7. La aparición de un color púrpura alrededor del material de colonia original en 20 segundos es una reacción L-ALA positiva. Una reacción positiva indica que el microorganismo **no** es una especie de *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.

Si no se desarrolla color alrededor del material de colonia original en 20 segundos, se trata de una reacción negativa. Una reacción negativa indica que el microorganismo es una presunta especie de *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.

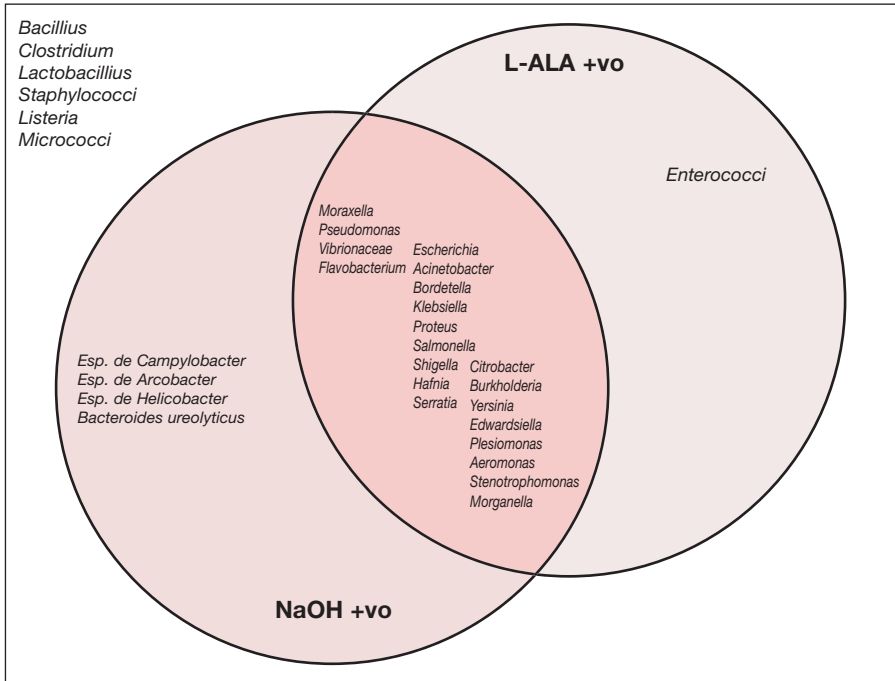
### Tabla de interpretación

Reacciones típicas:

Microorganismo	OHNa 0,5M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (ejem, gramneg.)	-
Grampositivos	- (ejem, grampos.)	-
Otros gramnegativos	+ (ejem, gramneg.)	+

## Diagrama de Venn

El diagrama de Venn demuestra cómo pueden diferenciarse *Campylobacter* y microorganismos relacionados con *Campylobacter* de otras bacterias comunes usando la lisis Gram y las pruebas de L-ALA de O.B.I.S. Campy.



## Limitaciones de la prueba

O.B.I.S. Campy está pensado para la detección de L-alanil aminopeptidasa en microorganismos gramnegativos. Puede usarse para la identificación de presunción de *Campylobacter* y microorganismos relacionados a partir de cultivos puros.

La reacción con la prueba de L-ALA del O.B.I.S. es un marcador de actividad enzimática y ocasionalmente pueden producirse cepas atípicas. *Bacteroides ureolyticus* puede dar las mismas reacciones que las especies de *Campylobacter*. Sin embargo, la morfología de sus colonias y la anaerobiosis ayudan en la diferenciación.

Con el tiempo, el revelador DMAC puede dar una reacción ligeramente rosa con el tampón Campy incluso en negativos. Sin embargo, esto se diferencia fácilmente de la reacción claramente púrpura que se ve alrededor del material de colonia en un positivo.

No use asas de alambre de níquelcromo para inocular las tarjetas, porque este material puede interferir con la prueba.

## Rendimiento

En un estudio interno, se estudiaron 46 especies de *Campylobacter* y 6 especies de *Arcobacter*. Todas dieron reacción gramnegativa, L-ALA negativa. Se estudiaron otras 252 especies (no-*Campylobacter*, *Arcobacter* ni *Helicobacter*). Sólo un microorganismo dio un resultado similar a *Campylobacter* y se debió a una reacción de lisis Gram atípica. Esto dio como resultado una sensibilidad y una especificidad del 100% y el 99,6% respectivamente<sup>3</sup>.

# OXOID BIOCHEMISCHES IDENTIFIZIERUNGS SYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY

## Verwendungszweck

Der O.B.I.S. Campy-Test (Oxid Biochemisches Identifizierungs System (O.B.I.S.) ist ein einfacher kolorimetrischer Schnelltest zum Nachweis von L-Alanyl - Aminopeptidase. Es wurde zur Differenzierung von *Campylobacter*-, *Helicobacter*- und *Arcobacter*-Spezies von anderen gramnegativen Keimen entwickelt, und enthält einen Gram-Lyse-Test, der den Gramstatus aufzeigt.

## Testsprinzip

Der O.B.I.S. Campy-Test differenziert Spezies von *Campylobacter*, *Helicobacter* und *Arcobacter* von allen anderen gramnegativen Keimen<sup>1</sup>. Anders als andere gramnegative Keime besitzen *Campylobacter* nicht das Enzym L-Alanyl-Aminopeptidase (L-ALA). Der O.B.I.S. Campy-Test enthält einen Schnelltest zum Nachweis dieses Enzyms und ein Gram-Lyse-Reagenz, das schnell den Gramstatus bestimmt.

Zuerst muss der Gram-Lyse-Test (oder eine Gramfärbung) durchgeführt werden. Dieser Test unterscheidet grampositive und gramnegative Bakterien<sup>2</sup>. Der Test sollte auf einem Objektträger durchgeführt werden. Natriumhydroxid (0,5M) wird zur Lyse der Zellwände von gramnegativen Keimen und auch zum Freisetzen der DNA verwendet. Die DNA bildet einen Strang, der sichtbar wird, wenn man die Impföse von der Oberfläche des Objektträgers anhebt. Diese Reaktion tritt nicht bei grampositiven Keimen auf.

Nachdem der Keim als gramnegativ identifiziert wurde, kann der L-ALA-Test durchgeführt werden.

Jede O.B.I.S.-Reaktionskarte ist in allen sechs Reaktionsfeldern mit dem L-ALA-Substrat (L-Alanyl-7-amino-4-methylcoumarin) imprägniert. Eine saure Lösung von Dimethylaminocinnamaldehyd (DMAC) wird als Farbentwickler verwendet. Falls das Substrat durch den Keim hydrolysiert wurde, bildet das freie Amino-4-Methylcoumarin mit dem Entwickler eine Schiff'sche-Base, welches als violette Färbung sichtbar wird.

## Bestandteile des Tests (ID0800M)

Jede Packung O.B.I.S. Campy-Kit beinhaltet die folgenden Reagenzien, ausreichend für 60 Tests:

- ID0803M** O.B.I.S. Campy-Testkarten – ein wieder verschließbarer Beutel enthält 10 Karten, jede dieser Karten hat sechs Reaktionsfelder.
- ID0804M** O.B.I.S. Campy-Testpuffer – ein Tropffläschchen mit weißem Verschuß, das 7 ml Lösung enthält.
- ID0221M** O.B.I.S. DMAC-Entwickler – ein Tropffläschchen, mit violettem Verschuß das 7 ml 0,5% w/v Dimethylaminocinnamaldehyd in 1 M Salzsäure enthält.
- ID0802M** 0,5M Natriumhydroxid – ein Fläschchen mit abgeflachtem weißen Verschuß, das 6 ml 0,5M NaOH enthält (ausreichend für 600 Gram-Lyse-Screeningtests).

**ID0898** 60 Plastikpastetten.  
Gebrauchsanleitung.

### **Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien**

Saubere Objektträger.  
Sterile 10 µl Einwegimpfösen.  
Positive und negative Qualitätskontrollstämme.  
Schere

### **Vorsichtsmaßnahmen**

*In vitro* Diagnostikum.

Nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.

Der DMAC Entwickler enthält eine schwache Säure und verfärbt die Haut. Die 0,5M Natriumhydroxidlösung ist korrosiv und kann Verbrennungen verursachen.

Gase und Dämpfe nicht einatmen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt mit den Augen sofort gründlich mit viel Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen. Nach Kontakt mit der Haut sofort gründlich mit viel Wasser abwaschen und einen Arzt aufsuchen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen.

Benutzte Testkarten und Impfösen sind als infektiöser Abfall zu entsorgen oder bei 121°C für 15 Minuten zu autoklavieren.

*Campylobacter* sind pathogen. Bereits eine niedrige Infektionsdosis kann Gastroenteritis mit möglichen schwerwiegenden Komplikationen verursachen. Bei der Handhabung von potenziell kontaminierten Proben sind die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

### **Lagerung und Öffnen**

Das O.B.I.S. Campy-Kit muss bei 2°C bis 8°C gelagert werden. Vor der Verwendung sollten die Beutel Raumtemperatur erreicht haben, um die Bildung von Kondenswasser auf den Testkarten zu verhindern.

Zum Öffnen den Beutel mittels einer Schere auf der Höhe der seitlichen Kerbe zwischen oberer Schweißnaht und dem Druckverschluß aufschneiden.

Die Anzahl benötigter Testkarten entnehmen und den Beutel wieder verschließen. Die Testkarten innerhalb von 60 Minuten verwenden.

Falls weniger Tests erforderlich sind, als die Anzahl der Tests auf der Testkarte, ist die Testkarte zu durchschneiden und der nicht verwendete Teil in den Beutel zurückzulegen. Verwendete Testkarten nicht in den Beutel zurück legen.

Nach längerfristiger Lagerung kommt es beim Natriumhydroxid zur Ausfällung - dies hat keinerlei Auswirkung auf die Performance. Es sollte stets eine sterile Impflohe verwendet werden. Bei offensichtlicher Kontamination sollte es entsorgt werden.

### **Kontrollverfahren**

Routinemäßig sollten folgende Kontrollmaßnahmen durchgeführt werden:

## Gram-Lysetest

1. **Positive Kontrolle** – Durchzuführen mit einem bekannten gramnegativen Keim (Gram Lyse positiv) z.B. *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Die im Testverfahren angegebene Methode verwenden.
2. **Negative Kontrolle** – Durchzuführen mit einem bekannten grampositiven Keim (Gram-Lyse negativ) z.B. *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Die im Testverfahren angegebene Methode verwenden.

## L-ALA Test

1. **Positive Kontrolle** – Durchzuführen mit einem bekannten L-ALA positiven Keim z.B. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Die im Testverfahren angegebene Methode verwenden. Sicherstellen, dass die violette Farbe sich innerhalb von 20 Sekunden um das Koloniematerial bildet.
2. **Negative Kontrolle** – Durchzuführen mit einem bekannten L-ALA negativen Keim z.B. *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Die im Testverfahren angegebene Methode verwenden. Sicherstellen, dass sich innerhalb von 20 Sekunden keine violette Farbe bildet.

## Probenmaterial

Der Test dient zur Verwendung mit Reinkulturen, die z.B. auf Columbia Blut-Agar gewachsen sind. Es sollte kein Probenmaterial verwendet werden, das von einem Medium stammt, das der primären Isolierung dient, da die Kolonien eventuell zu klein oder zu wenige sind, um einen effektiven Test durchführen zu können. Kolonien mit typischer *Campylobacter*-Morphologie von *Campylobacter*-Selektivnährböden abimpfen und auf Columbia Blut-Agar ausstreichen. In einer mikroaeroben Atmosphäre 48 Stunden lang bebrüten, dann den O.B.I.S.-Test durchführen.

## Testverfahren und Interpretation der Ergebnisse

### Gram-Lysetest

1. Mit einer 10 µl Impföse 0,5M Natriumhydroxid lösung (Fläschchen mit weißem abgeflachten Verschluss) aufnehmen und auf einen sauberen Objektträger aufbringen.
2. Unter Verwendung einer sterilen Impföse eine kleine Menge Material der Reinkultur abnehmen.
3. Das Probenmaterial bis zu 1 Minute lang mit dem Natriumhydroxid auf dem Objektträger mischen.
4. In Abständen die Impföse immer wieder vorsichtig aus der Mischung heben, um das Vorhandensein eines viskösen Fadens zwischen der Impföse und der Mischung zu überprüfen.
5. Ergebnisse dokumentieren:
  - Ein positives Ergebnis ist charakterisiert durch ein visköses Erscheinungsbild der Mischung und dem Vorliegen eines DNA-Stranges. Dies zeigt an, dass der Keim **gramnegativ** ist.
  - Ein negatives Ergebnis wird charakterisiert durch die Bildung einer

Zellsuspension ohne einen Strang und zeigt an, dass der Keim **grampositiv** ist.

Dieser Test kann auch unter Verwendung von 0,5M Kaliumhydroxidlösung (KOH) durchgeführt werden. Alternativ kann auch eine traditionelle Gramfärbung zur Sicherstellung des Gramstatus des Keimes durchgeführt werden.

### L-ALA-Test

Nachdem der Keim als gramnegativ identifiziert wurde, kann der L-ALA-Test durchgeführt werden.

1. Testkarte aus dem Beutel entnehmen.
2. Unter Verwendung des Spatels einer nicht benutzten Plastikpastette von einer Reinkultur Koloniematerial entsprechend dem Äquivalent von 5x1 mm im Durchmesser auf das Testfeld übertragen.
3. Die Probe über das Reaktionsfeld (innerhalb des Kreises) einer Testkarte verteilen.
4. Einen Tropfen O.B.I.S. Campy-Puffer (Tropf fläschchen mit weißem Verschuß) auf jedes beimpfte Reaktionsfeld tropfen.
5. 30 Sekunden warten.
6. Einen Tropfen O.B.I.S. DMAC-Entwickler (violetter Verschuß) auf jedes beimpfte Reaktionsfeld tropfen.
7. Das Auftreten einer violetten Farbe um das ursprüngliche Koloniematerial innerhalb von 20 Sekunden ist eine positive L-ALA-Reaktion. Eine positive Reaktion zeigt an, dass der Keim **nicht** zu den *Campylobacter*-, *Helicobacter*- oder *Arcobacter*-Spezies gehört.

Falls sich innerhalb von 20 Sekunden um das ursprüngliche Koloniematerial keine Farbe entwickelt, dann ist dies eine negative Reaktion. Eine negative Reaktion zeigt an, dass der Keim wahrscheinlich zu den *Campylobacter*-, *Helicobacter*- oder *Arcobacter*-Spezies gehört.

### Interpretationstabelle

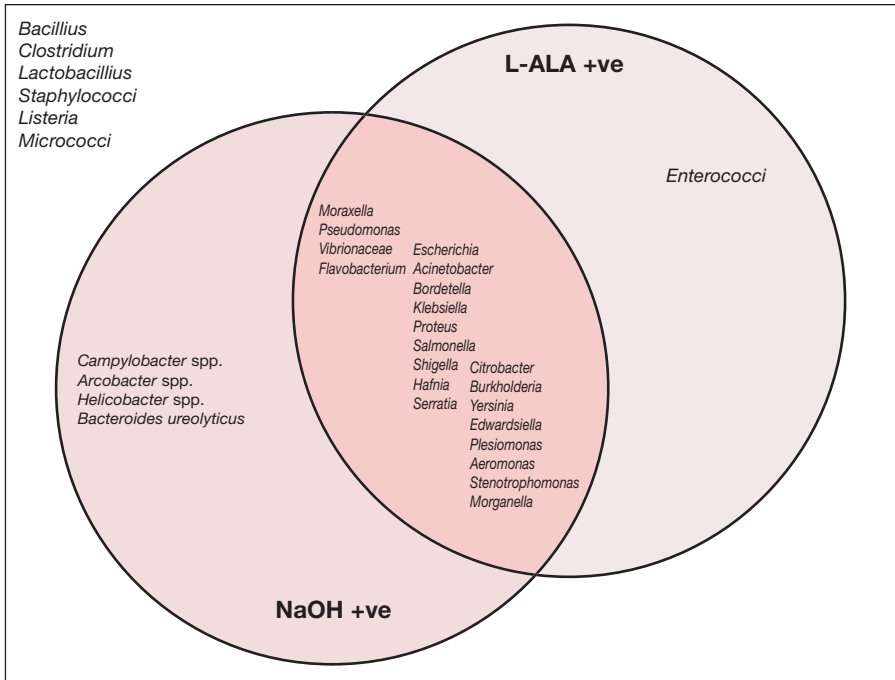
Typische Reaktion:

Keim	0,5M NaOH	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (d.h. gramneg.)	-
Grampositiv	- (d.h. grampos.)	-
Gramnegativ	+ (d.h. gramneg.)	+



## Venn-Diagramm

Das Venn-Diagramm zeigt, wie *Campylobacter* und *Campylobacter*-verwandte Keime durch die Verwendung des Gram-Lyse-Tests und des L-ALA-Tests von O.B.I.S. Campy unterschieden werden können.



## Grenzen des Tests

O.B.I.S. Campy dient dem Nachweis von L-Alanyl-Amino-peptidase in gramnegativen Keimen. Er kann zur präsumtiven Identifizierung von *Campylobacter* und *Campylobacter*-verwandten Keimen aus Reinkultur verwendet werden.

Der Reaktion mit dem O.B.I.S. Campy L-ALA-Test ist ein Marker für Enzymaktivität, wobei gelegentlich atypische Stämme auftreten. *Bacteroides ureolyticus* kann die selben Reaktionen aufweisen wie *Campylobacter*-Spezies. Die Kolonienmorphologie und die Anaerobiose helfen allerdings bei der Unterscheidung.

Nach längerem Zeitraum kann der DMAC-Entwickler – auch wenn ein negatives Ergebnis vorliegt – zusammen mit dem Campy-Puffer eine leichte rosa Reaktion zeigen. Diese kann aber sehr einfach von den eindeutig violetten Reaktionen, die bei positivem Ergebnis um das Koloniematerial herum zu beobachten sind, unterschieden werden.

Keine Nickelchrom-Impfösen zur Beimpfung der Karten verwenden, da dieses Material den Test stören kann.

## Leistungsmerkmale

In einer internen Studie wurden 46 *Campylobacter*-Spezies und 6 *Arcobacter*-Spezies getestet. Alle führten zu einer gramnegativen, L-ALA-negativen Reaktion. 252 andere Spezies (Nicht-*Campylobacter*, *Arcobacter* oder *Helicobacter*) wurden getestet. Nur ein einziger Keim ergab eine ähnliche Reaktion wie *Campylobacter*, und dies aufgrund einer atypischen Gram-Lyse-Reaktion. Dies führte zu einer Sensitivität und Spezifität von 100% beziehungsweise 99,6%<sup>3</sup>.

## **SYSTÈME D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE OXOID (O.B.I.S.)**

### **Utilisation prévue**

Le système d'identification biochimique OXOID (O.B.I.S.) est un test colorimétrique rapide et simple qui permet de détecter l'enzyme L-alanyl aminopeptidase. Il a été conçu pour différencier les espèces *Campylobacter*, *Helicobacter*, et *Arcobacter* et d'autres organismes Gram-négatif et intègre un test de lyse qui indique le type de Gram.

### **Principe du test**

Le test O.B.I.S. différencie les espèces *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Arcobacter* des autres organismes Gram-négatif<sup>1</sup>. Contrairement aux autres organismes Gram-négatif, les *Campylobacteraceae* ne possèdent pas l'enzyme L-alanyl aminopeptidase (L-ALA). Le test O.B.I.S. intègre un test rapide pour détecter l'enzyme et un réactif de lyse pour déterminer rapidement le type de Gram .

Tout d'abord, le test de Gram (ou coloration de Gram) doit être pratiqué. Ce test différencie les bactéries Gram-positif et les bactéries Gram-négatif<sup>2</sup>. Le test est pratiqué sur une lame de verre. De l'hydroxyde de sodium (0.5M) est utilisé pour lyser la paroi cellulaire des organismes Gram-négatif et pour libérer l'ADN. L'ADN forme une 'chaîne' qui est visible lorsque l'oese remonte à la surface de la lame. Cette réaction n'apparaît pas avec les organismes Gram-positif.

Une fois l'organisme identifié comme Gram-négatif, le test L-ALA peut être pratiqué.

Chaque carte de réaction O.B.I.S. a été imprégnée avec le substrat L-ALA (L-alanyl-7-amino-4-méthylcoumarine) dans chacune des six zones de réaction. Une solution acide de diméthylaminocinnamaldéhyde (DMAC) est utilisée comme révélateur chromogène. Si le substrat a été hydrolysé par l'organisme, la 7-amino-4-méthylcoumarine libérée se combinera au révélateur pour produire une base de Schiff violette.

### **Composants du Kit O.B.I.S. (ID0800M)**

Chaque kit contient les réactifs suivants pour 60 tests :

- ID0803M** Cartes de test O.B.I.S. – une pochette réutilisable contenant 10 cartes, chacune comportant six zones de réaction.
- ID0804M** Tampon O.B.I.S. – un flacon compte-gouttes à bouchon blanc contenant 7 ml de solution.
- ID0221M** Révélateur DMAC O.B.I.S. – un flacon compte-gouttes à bouchon violet contenant 7 ml de 0,5% p/v de diméthylaminocinnamaldéhyde dans acide chlorhydrique 1M.
- ID0802M** Hydroxyde de sodium 0.5M – un flacon blanc à bouchon plat contenant 6 ml de NaOH 0.5M (suffisant pour 600 colorations de Gram).
- ID0898** Pipettes – pack de 60.  
Mode d'emploi.

## Matériels nécessaires mais non fournis

Lames de verre proes.  
Oeses stériles jetables en plastique de 10 µl.  
Germes de contrôle positifs et négatifs.  
Ciseaux.

## Précautions d'emploi

Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro* exclusivement  
N'utilisez pas les réactifs O.B.I.S. au-delà de la date de péremption.  
Le Révélateur DMAC contient un acide faible et colorera la peau. La solution d'hydroxyde de sodium 0.5M est corrosive et peut provoquer des brûlures.  
Ne respirez pas la fumée/vapeur. Évitez tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincez immédiatement avec de l'eau et consultez un médecin. En cas de contact avec la peau, rincez abondamment et consultez un médecin. Portez des vêtements de protection, des gants et un masque.  
Les Cartes de test et les oeses usagées doivent être considérées comme des déchets biologiques dangereux. Elles doivent être incinérées ou passées à l'autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes.  
Les *Campylobacter* sont des organismes pathogènes. Une dose infectieuse faible peut entraîner une gastro-entérite et des complications potentiellement graves. Prenez les précautions nécessaires en manipulant des échantillons potentiellement contaminés.

## Conservation et ouverture

Conserver le coffret OBIS CAMPY à 2-8 °C. Avant utilisation, laisser les sachets revenir à température ambiante afin d'éviter l'apparition de condensation sur les cartes.  
Ouvrez les sachets en coupant juste au dessous du scellage.  
Retirez le nombre de Cartes de test nécessaire et refermez la poche pochette. Utilisez-les dans les 60 minutes.  
Si on ne veut utiliser que quelques tests, couper la carte et replacer la partie inutilisée dans le sachet. Ne pas y replacer les parties utilisées  
Une précipitation peut survenir lors du stockage prolongé de l'hydroxyde de sodium – ceci n'affecte en rien la performance du produit. Une anse oese stérile doit toujours être utilisée. Jetez-la en cas de signe évident de contamination.

## Procédure de contrôle de la qualité

La procédure suivante doit être menée pratiquée à chaque fois que le kit est utilisé:

### Test de Gram

1. **Contrôle positif** – utilisez un organisme Gram-négatif connu tel que *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Suivez la procédure indiquée dans le mode opératoire.
2. **Contrôle négatif** – utilisez un organisme Gram-positif connu tel que *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Suivre la procédure indiquée dans le mode opératoire.

## Test L-ALA

1. **Contrôle positif** – utilisez un organisme positif L-ALA, tel que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Suivre la procédure indiquée dans le mode opératoire. Vérifiez qu'une couleur violette se forme autour du matériel des colonies dans les 20 secondes.
2. **Contrôle négatif** – utilisez un organisme négatif L-ALA tel que *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Suivre la procédure indiquée dans le mode opératoire. Vérifiez qu'aucune couleur violette se forme dans les 20 secondes.

## Échantillons

Utiliser le test après avoir purifié la souche tel que sur la gélose au sang Columbia. Un milieu d'isolation d'isolement primaire ne doit pas être utilisé dans la mesure où les colonies peuvent être trop petites ou trop rares pour que le test soit efficace. Choisissez des colonies qui présentent une morphologie typique de *Campylobacter* à partir d'un milieu d'isolation *Campylobacter* et repiquez les dans de la gélose au sang Columbia. Incubez en atmosphère microaérobie pendant 48 heures puis pratiquez le test O.B.I.S.

## Mode opératoire du test et interprétation des résultats

### Test de Gram

1. Prélevez une anse oese de 10 µl de solution d'hydroxyde de sodium 0.5M (flacon blanc à bouchon plat) et déposez-la sur une lame de verre propre.
2. À l'aide d'une anse oese stérile, prélevez une petite quantité de matériel sur une boîte pour purifier.
3. Mélangez l'échantillon dans le NaOH sur la lame pendant une minute.
4. À intervalles réguliers, soulevez doucement l'oese du mélange pour vérifier la présence d'une 'chaîne' entre la anse et le mélange.
5. Enregistrez le résultat:
  - un résultat positif se caractérise par un aspect visqueux du mélange et la présence d'une chaîne d'ADN. Ceci indique que l'organisme est **Gram-négatif**.
  - Un résultat positif négatif se caractérise par la formation d'une suspension cellulaire sans chaîne; ceci indique que l'organisme est **Gram-positif**.

Ce test peut également être pratiqué à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5M. Sinon, une coloration de Gram traditionnelle peut être utilisée pour s'assurer du type de Gram du microorganisme.

### Test L-ALA

Une fois l'organisme identifié comme Gram-négatif, la partie L-ALA du test peut être pratiquée.

1. Retirez l'une des Cartes de test de la poche. du sachet.
2. À l'aide d'une pipette en plastique inutilisée, transférez l'équivalent de 5 colonies de 1 mm de diamètre de la boîte de gélose à la zone de test.
3. Étalez l'échantillon dans la zone de réaction (dans un cercle) d'une Carte de test.
4. Mettez une goutte du tampon O.B.I.S. (flacon compte-gouttes à bouchon blanc) sur chacune des zones de réaction inoculées.

5. Patientez 30 secondes.
6. Mettez une goutte de Révélateur DMAC O.B.I.S. (bouchon violet) sur chacune des zones inoculées.
7. Si une couleur violette apparaît autour de la colonie originale dans les 20 secondes, la réaction L-ALA est positive. Une réaction positive indique que l'organisme n'est **pas** une espèce *Campylobacter*, *Helicobacter* ou *Arcobacter*.

Si aucune couleur ne se forme autour de la colonie originale dans les 20 secondes, la réaction est négative. Une réaction négative indique que l'organisme est présumément une espèce *Campylobacter*, *Helicobacter* ou *Arcobacter*.

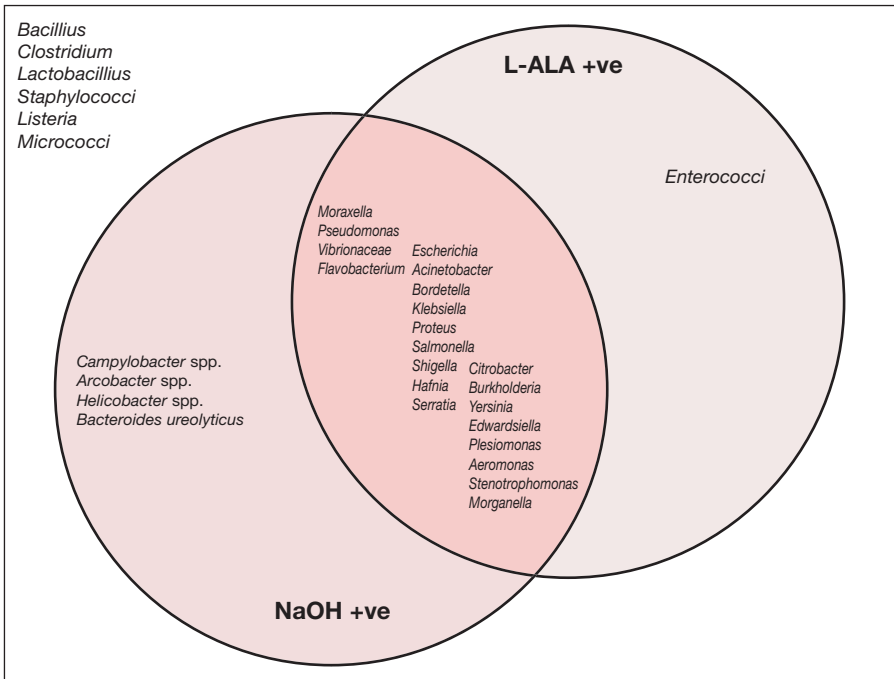
### Tableau d'interprétation

Réactions typiques:

Organisme	NaOH 0.5M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (c.-à-d. Gram-nég.)	-
Gram-positif	- (c.-à-d. Gram-pos.)	-
Autres Gram-négatif	+ (c.-à-d. Gram-nég.)	+

### Diagramme de Venn

Le diagramme de Venn montre comment les organismes associés à *Campylobacter* et *Campylobacter* apparentés peuvent être différenciés d'autres bactéries courantes à l'aide des tests de Gram et L-ALA de O.B.I.S.



## Limites du test

O.B.I.S est destiné à la détection de l'activité de la L-alanyl aminopeptidase dans les organismes Gram-négatif. Il peut être utilisé pour l'identification présumée de *Campylobacter* et organismes associés à partir d'une culture pure.

La réaction avec le test L-ALA O.B.I.S. est un marqueur pour l'activité enzymatique et des souches atypiques peuvent apparaître occasionnellement. L'espèce *Bacteroides ureolyticus* peut entraîner les mêmes réactions que l'espèce *Campylobacter*. Cependant, la morphologie de la colonie et l'anaérobiose permettent cette une différenciation.

Dans le temps, le Révélateur DMAC peut entraîner une réaction légèrement rose avec le tampon, même en cas de résultats négatifs. Cependant, cette réaction est facilement différenciable de la réaction violette observée autour de la colonie dans le cas de résultat positif.

N'utilisez pas d'oèses en nichrome pour inoculer les cartes, ce matériau pouvant interférer avec le test.

## Performance

Dans une étude interne, 46 espèces *Campylobacter* et 6 espèces *Arcobacter* ont été testées. Toutes ont entraîné une réaction Gram-négatif, L-ALA négatif. 252 autres espèces (non *Campylobacter*, *Arcobacter* ou *Helicobacter*) ont été testées. Seul un organisme a entraîné des résultats similaires à *Campylobacter*, et ceci était dû à une réaction Gram atypique. Les résultats ont donné respectivement une sensibilité et une spécificité de 100% et 99,6%, respectivement<sup>3</sup>.

## OXOID BIOCHEMICAL IDENTIFICATION SYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY

### Uso previsto

Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) campy è un test colorimetrico semplice e rapido per la rilevazione della L-alanilaminopeptidasi. È stato concepito per la differenziazione delle specie *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter* da altri organismi gram-negativi e incorpora un test di gram-lisi che evidenzia se i batteri sono Gram positivi oppure Gram negativi.

### Principio del test

Il test O.B.I.S. campy differenzia le specie di *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter* da tutti gli altri organismi gram-negativi<sup>1</sup>. A differenza di altri organismi gram-negativi, la specie *Campylobacteraceae* non possiede l'enzima L-alanilaminopeptidasi (L-ALA). O.B.I.S. campy incorpora un test rapido per rilevare questo enzima ed un reagente di gram-lisi per determinare rapidamente lo stato Gram.

In primo luogo, deve essere eseguito il test di gram-lisi (o una colorazione di Gram). Questo test è in grado di distinguere i batteri gram-positivi da quelli gram-negativi<sup>2</sup>. Il test viene eseguito su un vetrino. L'idrossido di sodio (0,5M) viene usato per lisare la parete cellulare degli organismi gram-negativi e rilasciare il DNA. Il DNA forma una sorta di 'laccio' che è possibile vedere quando l'ansa viene sollevata dalla superficie del vetrino. Questa reazione non avviene con gli organismi gram-positivi.

Una volta che l'organismo viene identificato come gram-negativo, è possibile eseguire il test L-ALA.

Ogni cartoncino di reazione è impregnato con il substrato L-ALA (L-alanil-7-amino-4-metilcumarina) in ognuna delle sei zone di reazione. Come sviluppatore di colore viene utilizzata una soluzione acida di dimetilaminoaldeide cinnaminica (DMAC). Se la sostanza è stata idrolizzata dall'organismo, la 7-amino-4-metilcumarina si combina con lo sviluppatore per produrre una base di Schiff color porpora.

### Componenti del kit O.B.I.S. campy (ID0800M)

Ogni kit contiene i seguenti reagenti con materiale sufficiente per 60 test:

- ID0803M** cartoncini di reazione O.B.I.S. campy – una busta richiudibile contiene 10 cartoncini, ognuno con sei zone di reazione;
- ID0804M** tampone O.B.I.S. campy – una boccetta contagocce con tappo bianco contiene 7 ml di soluzione;
- ID0221M** sviluppatore O.B.I.S. DMAC - una boccetta contagocce con tappo color porpora contiene 7 ml di dimetilaminoaldeide cinnaminica allo 0,5% w/v in acido cloridrico 1M;
- ID0802M** idrossido di sodio 0,5M – un flacone con tappo bianco piatto contiene 6 ml di NaOH 0,5M (sufficiente per 600 test di screening di gram-lisi);
- ID0898** spatole – confezione da 60;  
foglio di istruzioni.



## Materiali richiesti ma non inclusi

Vetrini puliti.

Anse per inoculazione monouso di plastica sterili da 10 µl.

Organismi di controllo di qualità positivi e negativi.

Forbici.

## Precauzioni

Questo prodotto è destinato unicamente alla diagnosi *in vitro*.

Non usare i reagenti O.B.I.S. campy oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.

Lo sviluppatore DMAC contiene un acido blando e macchia la pelle. La soluzione di idrossido di sodio 0,5M è corrosiva e può causare ustioni.

Non inalare fumi/vapori. Evitare il contatto con cute e occhi. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. In seguito al contatto con la cute, lavare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Indossare abbigliamento protettivo adeguato, guanti e occhiali/maschera di protezione.

I cartoncini di reazione usati e le anse per inoculo devono essere smaltite come materiale biologico. Devono essere incenerite o sterilizzate in autoclave a 121°C per almeno 15 minuti.

I *Campylobacter* sono agenti patogeni. Una dose lievemente infettiva può causare gastroenteriti con complicanze potenzialmente gravi. Adottare precauzioni adeguate nel maneggiare i campioni potenzialmente contaminati.

## Conservazione e apertura

Il kit O.B.I.S. campy deve essere conservato ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C. Portare le buste a temperatura ambiente prima dell'uso, per evitare la formazione di condensa sui cartoncini di reazione.

Aprire le buste tagliando in corrispondenza della tacca tra il sigillo finale e l'apertura a clip.

Estrarre il numero di cartoncini di reazione necessario e richiudere la busta. Usare le cartine entro 60 minuti.

Se sono necessari meno test del numero indicato, tagliare il cartoncino e reinserire la parte inutilizzata nella busta. Non reinserire i cartoncini usati nella busta.

Dopo un lungo periodo di conservazione subentra una precipitazione dell'idrossido di sodio; questo non altera la validità del prodotto. Usare sempre un'ansa sterile. Gettarla in caso di evidente contaminazione.

## Procedura di controllo della qualità

Eeguire la seguente procedura ogni volta che si usa il kit:

### Test di gram-lisi

1. **Controllo positivo** – usare un noto organismo gram-negativo (gram-lisi positivo), come *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Seguire il metodo indicato nella procedura del test.
2. **Controllo negativo** – usare un noto organismo gram-positivo (gram-lisi negativo), come *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Seguire il metodo indicato nella procedura del test.

## Test L-ALA

1. **Controllo positivo** – usare un noto organismo L-ALA positivo, come *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Seguire il metodo indicato nella procedura del test. Assicurarsi che nell'arco di 20 secondi la zona intorno al materiale della colonia assuma una colorazione porpora.
2. **Controllo negativo** – usare un noto organismo L-ALA negativo, come *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Seguire il metodo indicato nella procedura del test. Assicurarsi che nell'arco di 20 secondi non si formi alcuna colorazione porpora.

## Campioni

Il test è destinato a test da piastre per la verifica della purezza, come Columbia Blood Agar. Non utilizzare terreni di isolamento primario, in quanto le colonie possono essere troppo piccole o troppo poche per eseguire un test efficace. Prelevare da agenti isolanti selettivi per il *Campylobacter* colonie con morfologia tipica e strisciarle su piastre di Columbia Blood Agar. Incubare in atmosfera microaerobica per 48 ore, quindi eseguire il test O.B.I.S.

## Procedura del test e interpretazione dei risultati

### Test di gram-lisi

1. Prelevare con un'ansa 10 µl di soluzione di idrossido di sodio 0,5M (flacone con tappo bianco piatto) ed eseguire uno striscio su un vetrino pulito.
2. Con un'ansa sterile, prelevare una piccola quantità di materiale da una piastra per la verifica della purezza.
3. Miscelare il campione con la soluzione di NaOH sul vetrino per un minuto.
4. A intervalli, sollevare attentamente l'ansa dalla miscela per verificare la presenza di una sorta di 'laccio' tra l'ansa e la miscela.
5. Registrare il risultato:
  - un risultato positivo è caratterizzato da un aspetto viscoso della miscela e dalla presenza del laccio di DNA. Questo indica che l'organismo è **gram-negativo**.
  - Un risultato negativo è caratterizzato dalla formazione di una sospensione cellulare con assenza del laccio e indica che l'organismo è **gram-positivo**.

Questo test può essere eseguito anche usando una soluzione di idrossido di potassio (KOH) di 0,5M. In alternativa, è possibile utilizzare una tradizionale colorazione di Gram per accertare lo stato Gram dell'organismo.

## Test L-ALA

Una volta che l'organismo viene identificato come gram-negativo, è possibile eseguire la parte L-ALA del test.

1. Estrarre un cartoncino di reazione dalla busta.
2. Usando l'estremità di una spatola di plastica fornita nella confezione, trasferire l'equivalente di 5 colonie da 1 mm di diametro da una piastra per la verifica della purezza alla zona test.
3. Distribuire il campione sulla zona di reazione (all'interno di un cerchio) di un cartoncino di reazione.

4. Versare una goccia di tampone O.B.I.S. campy (boccetta contagocce con tappo bianco) su ognuna delle zone di reazione inoculate.
5. Attendere 30 secondi.
6. Versare una goccia di sviluppatore O.B.I.S. DMAC (tappo color porpora) su ognuna delle zone di reazione inoculate.
7. La comparsa del color porpora intorno al materiale della colonia originale nell'arco di 20 secondi costituisce una reazione L-ALA positiva. Una reazione positiva indica che l'organismo **non** è una specie *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.

Se intorno al materiale della colonia originale non compare alcun colore nell'arco di 20 secondi, questa è una reazione negativa. Una reazione negativa indica che l'organismo è una presunta specie *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter*.

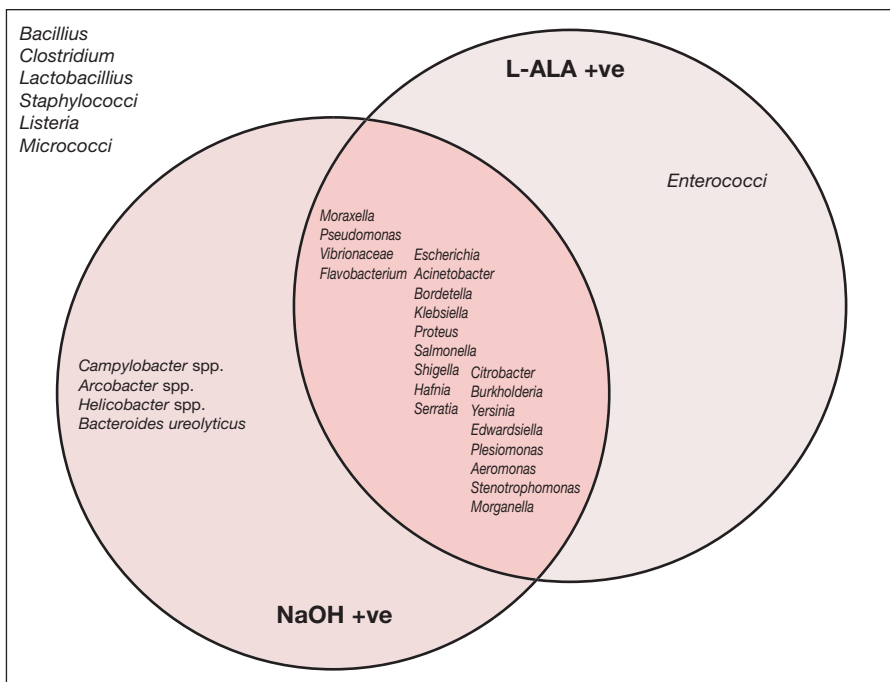
### Schema d'interpretazione

Reazioni tipiche:

Organismo	NaOH 0,5M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (vale a dire gram-neg.)	-
Gram-positivi	- (vale a dire gram-pos.)	-
Altri gram-negativi	+ (vale a dire gram-neg.)	+

### Diagramma di Venn

Il diagramma di Venn dimostra in che modo gli organismi correlati a *Campylobacter* e *Campylobacter* possono essere distinti da altri batteri comuni utilizzando i test di gram-lisi e L-ALA di O.B.I.S. campy.



## Limitazioni del test

Il test O.B.I.S campy è destinato alla rilevazione della L-alanil-aminopeptidasi negli organismi gram-negativi. Può essere utilizzato per la presunta identificazione di *Campylobacter* e degli organismi correlati da una coltura pura.

La reazione con il test O.B.I.S. campy L-ALA è un marcatore dell'attività enzimatica e possono occasionalmente venire evidenziati ceppi atipici. I *Bacteroides ureolyticus* possono dare le stesse reazioni delle specie *Campylobacter*. Tuttavia, la morfologia delle loro colonie e l'anaerobiosi contribuiscono alla differenziazione.

Nel corso del tempo, lo sviluppatore DMAC può dare una reazione leggermente rosata con il tampone campy anche nei negativi. Tuttavia, questa si differenzia facilmente dalla reazione di colore chiaramente porpora che si osserva intorno al materiale della colonia in un positivo.

Non usare anse di metallo al nichel-cromo per inoculare i cartoncini, in quanto questo materiale interferisce con il test.

## Validità

In uno studio interno, sono state testate 46 specie di *Campylobacter* e 6 specie di *Arcobacter*. Tutte hanno fornito una reazione gram-negativa e negativa all'L-ALA. Sono state testate altre 252 specie (non-*Campylobacter*, *Arcobacter* o *Helicobacter*). Solo un organismo ha fornito un risultato simile a *Campylobacter* a causa di una reazione di gram-lisi atipica. Questo ha comportato una sensibilità ed una specificità rispettivamente del 100% e del 99,6%<sup>3</sup>.

## OXOID BIOCHEMICAL IDENTIFICATION SYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY

### Introdução

Oxoid Biochemical Identification System (OBIS) Campy é um teste colorimétrico simples e rápido para detecção de L-alanil aminopeptidase, desenvolvido para diferenciar as espécies *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter*, de outros microrganismos Gram-negativos. O teste incorpora também um ensaio de lise de Gram, ao qual demonstra se o agente é Gram-positivo ou negativo.

### Princípio do teste

O teste OBIS-campy diferencia as espécies *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter* de todas os outros microrganismos Gram-negativos<sup>1</sup>. Ao contrário dos outros microrganismos Gram-negativos, a família *Campylobacteraceae* não possui a enzima L-alanil aminopeptidase (L-ALA). O teste OBIS-campy consiste em um teste para detecção rápida desta enzima e um reagente de lise de Gram para diagnosticar rapidamente se o agente é Gram-positivo ou negativo.

A primeira etapa a ser realizada é o teste de lise de Gram (ou uma coloração de Gram), que diferencia bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>2</sup>. O teste é feito em uma lâmina de vidro onde ocorre a lise da parede celular dos microrganismos Gram-negativos, utilizando hidróxido de sódio (0,5M). Este processo libera do DNA, que em seguida, forma um 'cordão', visível quando a alça é elevada acima da superfície da lâmina, reação que não ocorre com microrganismos Gram-positivos.

Após confirmação de que o microrganismo é Gram-negativo, pode ser feito o teste de L-ALA.

Todas os cartões de reagente OBIS são impregnados com o substrato da L-ALA (L-alanil-7-amino-4-metilcumarina), em cada uma das seis áreas de reação. A revelação é feita com uma solução ácida de dimetilaminocinamaldeído (DMAC). Se o microrganismo tiver hidrolisado o substrato, a 7-amino-4-metilcumarina liberada reage com o agente revelador, produzindo uma base de Schiff púrpura.

### Componentes do kit OBIS-campy (ID0800M)

Cada kit contém os seguintes reagentes, suficientes para 60 testes:

- ID0803M** Cartões de teste OBIS-campy: um envelope contendo dez cartões, com seis áreas de reação cada.
- ID0804M** Tampão OBIS-campy: um frasco conta-gotas contendo 7 mL de solução.
- ID0221M** Revelador DMAC OBIS: um frasco conta-gotas contendo 7 mL de dimetilaminocinamaldeído a 0,5% (peso/volume) em ácido clorídrico a 1M.
- ID0802M** Hidróxido de sódio a 0,5M: um frasco conta-gotas contendo 6 mL de NaOH a 0,5M (suficiente para 600 testes de lise de Gram).
- ID0898** Pipeta plástica Pasteur – pacote com 60.  
Folheto de instruções.

### Materiais necessários, mas não fornecidos

Lâminas de vidro limpas

Alças plásticas de inoculação estéreis e descartáveis para 10 µL.  
Microrganismos controle – positivos e negativos.  
Tesoura.

### Precauções

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Não utilizar reagentes OBIS-campy com prazo de validade vencido.

O revelador DMAC contém um ácido fraco, que mancha a pele. O hidróxido de sódio a 0,5M é corrosivo e pode causar queimaduras.

Não inalar os gases ou vapores e evitar o contato com a pele e olhos. Em caso de contato com os olhos ou pele, enxaguar imediatamente com bastante água e procurar orientação médica. Usar roupas protetoras adequadas, luvas e proteção para os olhos e face.

Os cartões de teste e alças de inoculação usadas devem ser descartadas no lixo biológico, cujo tratamento consiste em incineração ou autoclagem a 121°C por pelo menos 15 minutos.

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são patogênicos. A dose infectante é pequena, e o agente é capaz de causar gastroenterite, que às vezes produz complicações graves. Tomar as precauções apropriadas ao manusear amostras potencialmente contaminadas.

### Armazenamento e abertura

O kit OBIS-campy deve ser armazenado entre 2°C e 8°C. Antes de usar, permitir que os envelopes atinjam a temperatura ambiente, para que não haja condensação sobre os cartões de teste.

Abrir os envelopes cortando no sulco entre o fecho e o clipe de abertura.

Retirar a quantidade de cartões suficientes para o teste e fechar o envelope.

Utilizar em 60 minutos.

Se o número de testes necessário for menor que o número no cartão de teste, cortar o cartão e retornar a parte não utilizada o envelope. Não recolocar cartões de teste usados no envelope.

O hidróxido de sódio apresentará precipitação após armazenamento prolongado, mas este fenômeno não afeta o desempenho do teste. Utilizar sempre uma alça estéril. Se houver contaminação visível, descartar.

### Procedimento de controle de qualidade

Cada vez que o kit for usado, os seguintes procedimentos devem ser realizados:

#### Teste de lise de Gram

1. **Controle positivo:** usar um microrganismo sabidamente Gram-negativo (positivo para lise de Gram), tal como o *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Seguir a metodologia descrita no procedimento do teste.
2. **Controle negativo:** usar um microrganismo sabidamente Gram-positivo (negativo para lise de Gram), tal como o *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Seguir a metodologia descrita no procedimento de teste.

#### Teste de L-ALA

1. **Controle positivo:** usar um microrganismo sabidamente positivo para o teste

de L-ALA, tal como a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Seguir a metodologia descrita no procedimento de teste. Em 20 segundos, uma cor púrpura deverá se formar em torno do da colônia/esfregação.

2. **Controle negativo:** usar um microrganismo sabidamente L-ALA-negativo, tal como o *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Seguir a metodologia descrita no procedimento de teste. Não deverá surgir cor púrpura em 20 segundos.

## Amostras

O teste foi desenvolvido para uso em placas de isolamento/purificação, tal como Agar Sangue Columbia. Os meios primários de isolamento não devem ser usados, pois pode não haver colônias em quantidade ou tamanho suficientes para o teste. Escolher colônias com morfologia típica para *Campylobacter* de meios seletivos de isolamento de *Campylobacter* e repicar no Agar Sangue Columbia. Incubar em atmosfera de microaerofilia por 48 horas e após esse período, realizar o teste OBIS.

## Procedimento do teste e interpretação dos resultados

### Teste de lise de Gram

1. Com o auxílio de uma alça de 10 µL, transferir esse volume de hidróxido de sódio a 0,5M (frasco conta-gotas branco) para uma lâmina de vidro limpa.
2. Usar uma alça estéril e coletar uma pequena quantidade de colônias da placa de isolamento/ purificação.
3. Misturar a amostra com o NaOH sobre a lâmina durante pelo menos um minuto.
4. Com intervalos, retirar a alça de dentro mistura com cuidado para verificar se há um 'cordão' entre a alça e a mistura.
5. Anotar o resultado:
  - Um resultado positivo tem como características uma mistura de aspecto viscoso e a presença de um cordão de DNA. Essa observação indica que o microrganismo é **Gram-negativo**.
  - Um resultado negativo é caracterizado pela formação de uma suspensão celular sem cordão, indicando a presença de um microrganismo **Gram-positivo**.

O teste também pode ser realizado com solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,5M. Outra possibilidade é verificar se o microrganismo é positivo ou negativo fazendo uma coloração de Gram.

### Teste de L-ALA

Após a confirmação de que o microrganismo é Gram-negativo, realizar a etapa seguinte: o teste de L-ALA.

1. Retirar um cartão de teste do envelope.
2. Retirar com a parte plana de uma pipeta não utilizada o equivalente a 5 colônias de 1 mm de diâmetro de uma placa de isolamento para a área de teste.
3. Espalhar a amostra em torno da área de reação (dentro do círculo) de um cartão de teste.
4. Espalhar uma gota do tampão OBIS-campy (frasco conta-gotas de tampa branca) em cada uma das áreas de reação inoculadas

5. Esperar 30 segundos.
6. Colocar uma gota do revelador DMAC OBIS (tampa roxa) em cada uma das áreas de reação inoculadas.
7. O surgimento, em 20 segundos, de uma cor roxa em torno do material originário da colônia constitui uma reação positiva para L-ALA. Uma reação positiva significa que o microrganismo **não pertence** às espécies *Campylobacter*, *Helicobacter* ou *Arcobacter*.

Se não surgir nenhuma coloração em torno da colônia original em 20 segundos, a reação é considerada negativa. Se a reação for negativa, poderá ser presumido que o microrganismo é da espécie *Campylobacter*, *Helicobacter* ou *Arcobacter*.

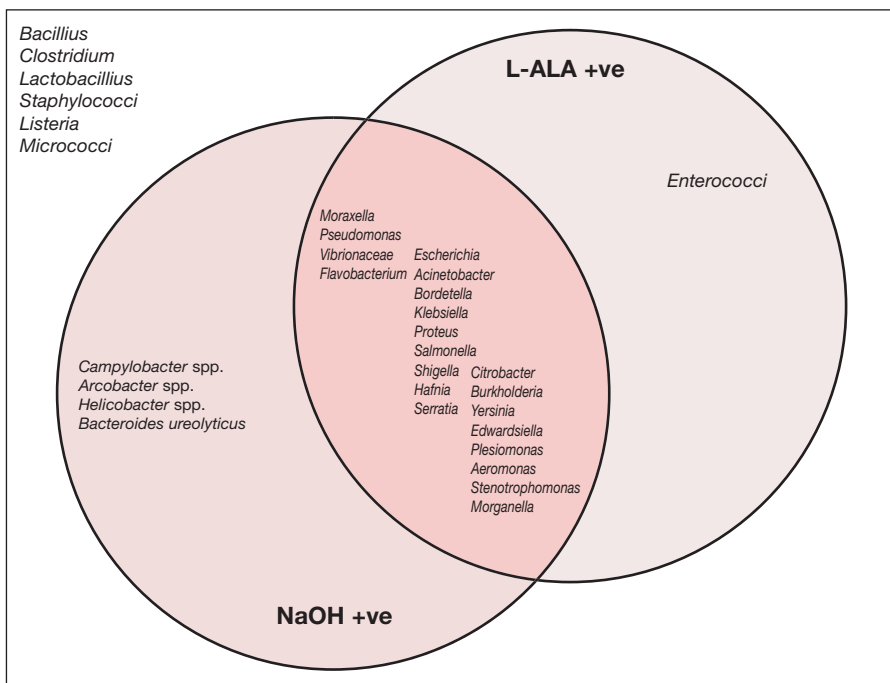
### Tabela de interpretação

Reações típicas

Microrganismo	NaOH 0,5M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (Gram-negativo)	-
Gram-positivos	- (Gram-positivo)	-
Outros Gram-negativos	+ (Gram-negativo)	+

### Diagrama de Venn

O diagrama de Venn mostra como o *Campylobacter* e os microrganismos a ele relacionados podem ser diferenciados de outras bactérias em comum utilizando os testes de lise de Gram e L-ALA do kit OBIS-campy.





## Limitações do teste

O objetivo do sistema OBIS-campy é detectar a L-alanil aminopeptidase presente em microrganismos Gram-negativos. Podendo ser utilizado para o diagnóstico presuntivo de *Campylobacter* e microrganismos relacionados em culturas puras.

A reação com o teste L-ALA OBIS-campy é um marcador de atividade enzimática. Às vezes, podem ser encontradas cepas atípicas. O *Bacteroides ureolyticus* pode produzir uma reação semelhante à que ocorre com as espécies de *Campylobacter*; no entanto, a morfologia das colônias e a anaerobiose ajudam na diferenciação.

Com o tempo, o revelador DMAC pode produzir uma ligeira reação rosa com o tampão campy, mesmo em amostras negativas, mas este achado é fácil de distinguir da nítida reação púrpura observada em torno do material da colônia em amostras positivas.

Não usar alças de níquel-cromo para inocular os cartões, pois este material pode interferir com o teste.

## Características de Desempenho

Em um estudo interno, foram testadas 46 espécies de *Campylobacter* e 6 espécies de *Arcobacter*. Todas produziram uma reação de L-ALA Gram-negativa. Também foram testadas 252 outras espécies além de *Campylobacter*, *Arcobacter* ou *Helicobacter*). Apenas um microrganismo produziu uma reação semelhante à do *Campylobacter*, cuja causa foi uma reação atípica de lise de Gram. Portanto, a técnica mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,6%<sup>3</sup>.

## OXOID BIOKEMISK IDENTIFIKATION SYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY

### Tilsigtet brug

O.B.I.S. campy er en enkel og hurtig kolorimetrisk test til påvisning af L-alanyl aminopeptidase. Den er designet til at differentiere *Campylobacter*, *Helicobacter* og *Arcobacter* arter fra andre Gram-negative organismer og inkorporerer en Gram-lyse test, som påviser Gram-statusen.

### Testens princip

O.B.I.S. campy testen differentierer *Campylobacter*, *Helicobacter* og *Arcobacter* arter fra alle andre Gram-negative organismer<sup>1</sup>. Til forskel fra andre Gram-negative organismer er *Campylobacter* ikke i besiddelse af L-alanyl aminopeptidase (L-ALA). O.B.I.S. campy testen inkorporerer en hurtig test til påvisning af dette enzym og et Gram-lyse reagens til hurtig bestemmelse af Gram-statusen.

Først skal der udføres en Gram-lyse test (eller en Gram-farvning). Denne test differentierer mellem Gram-positive og Gram-negative bakterier<sup>2</sup>. Testen udføres på et objektglas. Natriumhydroxid (0,5M) anvendes til lysning af cellevæggen hos Gram-negative organismer og frigørelse af DNA'et. DNA'et danner en 'streng', som kan ses, når øjepodenålen tages op fra objektglassets overflade. Denne reaktion sker ikke med Gram-positive organismer.

Når organismen er identificeret som Gram-negativ, kan L-ALA testen udføres.

Hver af de seks reaktionszoner på O.B.I.S. reaktionskortene er imprægneret med L-ALA-substrat (L-alanyl-7-amino-4-methylcoumarin). En sur opløsning af dimethylaminocinnamaldehyd (DMAC) anvendes som farveudvikler. Hvis substratet hydrolyseres af organismen, vil det frie 7-amino-4-methylcoumarin indgå forbindelse med fremkalderen og producere en violet Schiff's base.

### O.B.I.S. campy kittets (ID0800M) komponenter

Hvert kit indeholder følgende reagenser med tilstrækkelige materialer til 60 test:

- ID0803M** O.B.I.S. campy testkort – en genlukkelig pose, der indeholder 10 kort, med seks reaktionszoner på hver.
- ID0804M** O.B.I.S. campy buffer – en dråbeflaske med hvidt låg, der indeholder 7ml opløsning.
- ID0221M** O.B.I.S. DMAC-farveudvikler – en dråbeflaske med violetlåg der indeholder 7 ml 0,5% w/v dimethylaminocinnamaldehyd i 1M saltsyre.
- ID0802M** 0,5M natriumhydroxid – en flaske med et fladt, hvidt låg, der indeholder 6 ml 0,5M NaOH (tilstrækkelig til 600 Gram-lyse screeninger).
- ID0898** Pasteur pipette-pinde – pakke med 60 stk.  
Vejledning.

### Nødvendige materialer, der ikke medfølger

Rene objektglas.

Sterile 10 µl engangs øjepodenåle af plast.

Positive og negative kvalitetskontrol-organismer.

Saks.

## Forholdsregler

Dette produkt er kun beregnet til in vitro diagnostisk brug.

O.B.I.S. campy-reagenserne må ikke anvendes efter udløbsdatoen.

DMAC-farveudvikler indeholder en svag syre og vil farve huden. 0,5M natriumhydroxid-opløsningen er ætsende og kan forårsage ættseskader.

Undgå indånding af dampe. Undgå kontakt med hud og øjne. Kommer stoffet i øjnene skal der straks skylles grundigt med vand og læge kontaktes. Ved kontakt med huden skal den omgående vaskes med masser af vand og læge kontaktes. Brug særligt arbejdstøj, beskyttelseshandsker og beskyttelsesbriller/ansigtsskærm.

Brugte testkort og podenåle skal bortskaffes som biofarligt affald. Dette skal forbrændes eller autoklaveres ved 121°C i mindst 15 minutter.

*Campylobacter* er patogener. En lav-infektøs dosis kan forårsage gastroenteritis med potentielt alvorlige komplikationer. Der skal træffes behørig forholdsregler ved håndtering af potentielt kontaminerede prøver.

## Opbevaring og åbning

O.B.I.S. campy-kittet skal opbevares ved temperaturer på mellem 2°C og 8°C. Poserne skal nå op på stuetemperatur før brug for at forhindre at der dannes kondens på testkortene.

Åbn poserne ved at klippe i hakket på folien ovenfor genforseglingen.

Tag det antal testkort ud der skal anvendes og genforsegl posen. Kortene skal anvendes indenfor 60 minutter.

Hvis der kræves færre test end antallet på testkortet, kan reaktionskortet klippes over, hvorefter den ubrugte del puttes tilbage i posen. Brugte testkort må ikke puttes tilbage i posen.

Der vil ske en udfældning efter længere tids opbevaring af natriumhydroxiden – dette har ikke nogen indvirkning på testen. Der skal altid anvendes en steril øjepodenål. Kassér kort, hvis der tydelige tegn på kontaminering.

## Procedure for kvalitetskontrol

Følgende procedure skal udføres hver gang kittet anvendes:

### Gram-lyse test

1. **Positiv kontrol** – brug en kendt Gram-negativ (Gram-lyse positiv) organisme, som fx *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Følg den metode, som er angivet i vejledningen.
2. **Negativ kontrol** – brug en kendt Gram-positiv (Gram-lyse negativ) organisme som fx *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Følg den metode, som er angivet i vejledningen.

## L-ALA Test

1. **Positiv kontrol** – brug en kendt L-ALA-positiv organisme, som fx *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Følg den metode, som er angivet i vejledningen. Kontrollér at der dannes en violet farve omkring kolonimaterialet indenfor 20 sekunder.
2. **Negativ kontrol** – brug en kendt L-ALA-negativ organisme, som fx *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Følg den metode, som er angivet i vejledningen. Kontrollér, at der ikke dannes nogen violet farve indenfor 20 sekunder.

## Prøver

Testen er designet til brug fra rendyrkede plader, som fx Columbia blodagar. Primære isoleringsmedier bør ikke anvendes, da kolonierne kan være for små eller for få til at udføre en effektiv test. Vælg kolonier med typisk *Campylobacter* morfologi fra selektive *Campylobacter* isoleringsmedier og udstryk dem på Columbia blodagar. Inkubér i en mikroaerofil atmosfære i 48 timer og udfør derefter O.B.I.S. testen.

## Testprocedure og fortolkning af resultater

### Gram-lyse test

1. Fyld en 10 µl øjepodenål med 0,5M natriumhydroxid opløsning (flaske med fladt, hvidt låg) og placer den på et rent objektglas.
2. Brug en steril podenål og tag en lille mængde materiale fra en selektiv plade.
3. Bland prøven med NaOH på glasset i op til et minut.
4. Med jævne mellemrum løftes podenålen op af blandingen for at tjekke, om der er en 'streng' mellem podenålen og blandingen.
5. Notér resultatet:
  - Et positivt resultat er karakteriseret ved at blandingen har et viskøst udseende og ved tilstedeværelsen af DNA-strengen. Dette indikerer, at organismen er **Gram-negativ**.
  - Et negativt resultat er karakteriseret ved dannelsen af en celleopløsning uden nogen streng, hvilket indikerer at organismen er **Gram-positiv**.

Denne test kan også udføres med en 0,5M kaliumhydroxid- (KOH) opløsning. Der kan også bruges en traditionel Gram-farvning for at bestemme organismens Gram-status.

### L-ALA-test

Når organismen er identificeret som Gram-negativ, kan L-ALA delen af testen udføres.

1. Tag et af testkortene ud af posen.
2. Brug den flade ende af en ny plast-Pasteur-pipette og overfør det, der svarer til 5 kolonier, på hver 1mm i diameter, fra en selektiv plade til testområdet.
3. Spred prøven henover reaktionszonen (indenfor en cirkel) på testkortet.
4. Tilsæt en dråbe O.B.I.S. campy-buffer (dråbeflaske med hvidt låg) på hver af de inokulerede reaktionszoner.

5. Vent 30 sekunder.
  6. Tilsæt en dråbe O.B.I.S. DMAC-farveudvikler (violet låg) på hver af de inokulerede reaktionszoner.
  7. Forekomsten af en violet farve rundt om det originale kolonimateriale indenfor 20 sekunder er en positiv L-ALA reaktion. En positiv reaktion indikerer, at organismen **ikke** er en *Campylobacter*, *Helicobacter* eller *Arcobacter* art.
- Hvis der ikke udvikles nogen farve omkring det originale kolonimateriale indenfor 20 sekunder, er det en negativ reaktion. En negativ reaktion indikerer, at organismen er en presumptiv *Campylobacter*, *Helicobacter* eller *Arcobacter* art.

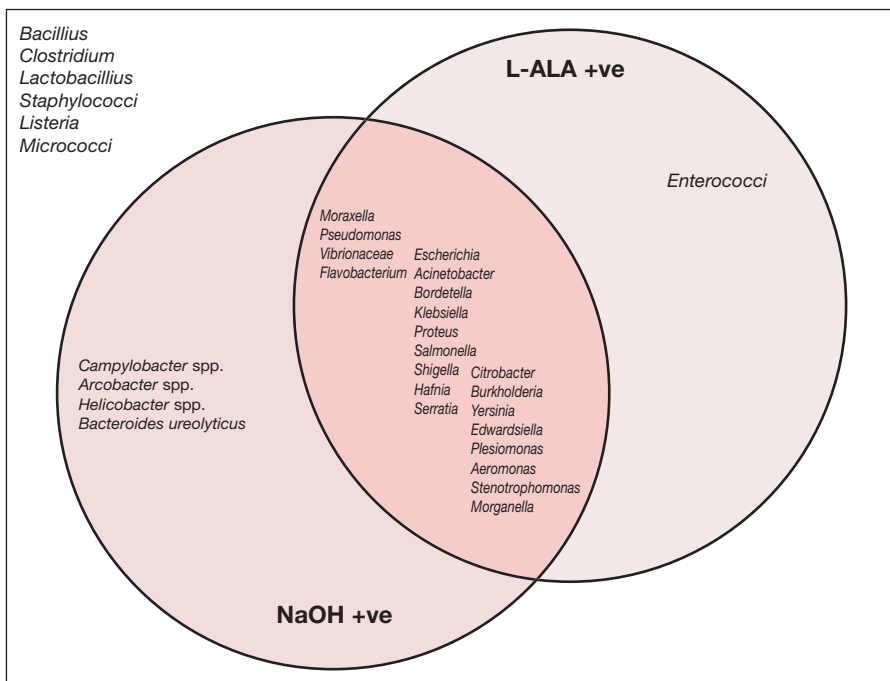
## Fortolkningsskema

Typiske reaktioner:

Organisme	0,5M NaOH	L-ALA
<i>Campylobacter</i>	+ (dvs. Gram neg)	-
Gram-positive	- (dvs. Gram pos)	-
Andre Gram-negative	+ (dvs. Gram neg)	+

## Venn diagram

Venn diagrammet viser, hvordan *Campylobacter* og *Campylobacter*-relaterede organismer kan differentieres fra andre almindeligt forekommende bakterier ved brug af O.B.I.S. campy's Gram-lyse og L-ALA testen.



## Procedurebegrænsninger

O.B.I.S campy er beregnet til påvisning af L-alanyl aminosyrase i Gram-negative organismer. Den kan anvendes til presumptiv identificering af *Campylobacter* og relaterede organismer fra rendyrkninger.

Reaktionen med O.B.I.S. campy L-ALA testen er en enzymaktivitet-markør og atypiske stammer kan lejlighedsvist forekomme. *Bacteroides ureolyticus* kan give de samme reaktioner som *Campylobacter* arter. Deres kolonimorfologi og anaerobiose bidrager dog til differentiering.

Over en længere periode kan DMAC-farveudvikleren give en svag lyserød reaktion med campy-bufferen selv med negative prøver. Det er dog let at differentiere fra den tydelig violette reaktion, som ses rundt om kolonimaterialet for positive prøver.

Der må ikke anvendes pudenåle af nichrom – (jern) til inokulering af kort, da dette materiale kan påvirke testen.

## Ydelse

I en intern undersøgelse blev der testet 46 *Campylobacter* arter og 6 *Arcobacter* arter. Alle gav en Gram-negativ, L-ALA-negativ reaktion. 252 andre arter (non-*Campylobacter*, -*Arcobacter* og -*Helicobacter*) blev testet. Kun en organisme gav et *Campylobacter* lignende resultat og dette skyldtes en atypisk Gram-lyse reaktion. Dette resulterede i en sensitivitet og specificitet på henholdsvis 100% og 99,6%<sup>3</sup>.

## OXIDS BIOKEMISKA IDENTIFIERINGSSYSTEM (O.B.I.S.) CAMPY

### Avsedd användning

Oxids biokemiska identifieringssystem (O.B.I.S.) campy är en enkel, kolorimetrisk snabbtest för detektering av L-alanylaminopeptidas. Den har tagits fram för differentiering av arterna *campylobacter*, *helicobacter* och *arkebacter* från andra gramnegativa organismer och den innefattar en gram-lysis test som visar gram-resultatet.

### Testprincip

O.B.I.S.-campytesten differentierar arter av *campylobacter*, *helicobacter* och *arkebacter* från alla andra gramnegativa organismer<sup>1</sup>. Till skillnad från andra gramnegativa organismer innehåller *campylobacteraceae* inte enzymet L-alanylaminopeptidas (L-ALA). O.B.I.S.-campytestet innefattar ett snabbtest för detektering av detta enzym och en gram-lysis reagens för snabb bestämning av aktuellt gram-resultat.

Först måste gram-lysis testet (eller ett gramfärgningstest) utföras. Detta test differentierar mellan grampositiva och gramnegativa bakterier<sup>2</sup>. Testet utförs på ett objektglas. Natriumhydroxid (0,5M) används för att lösa upp cellväggen hos gramnegativa organismer och frigöra DNA. DNA bildar en 'sträng' som kan ses när spateln lyfts från glaset. Denna reaktion får man inte med grampositiva organismer.

När organismen har identifierats som gramnegativ kan L-ALA-testet utföras.

Varje O.B.I.S.-reagenskort har impregnerats med L-ALA-substratet (L-alanyl-7-amino-4-metylkoumarin) i var och en av de sex reaktionszonerna. En sur lösning av dimetylaminocinnamaldehyd (DMAC) används som färgframkallare. Om substratet hydrolyserats av organismen kombineras det fria 7-amino-4-metylkoumarinet med framkallaren och genererar en mörkklila schiffsbas.

### Komponenter i O.B.I.S.-campykitet (ID0800M)

Varje kit innehåller följande reagenser, som räcker till 60 tester.

- ID0803M** O.B.I.S.-campytestkort – en återförslutbar påse med 10 kort, vart och ett med sex reaktionszoner.
- ID0804M** O.B.I.S.-campybuffert – en droppflaska med vitt lock med 7 ml lösning.
- ID0221M** O.B.I.S. DMAC-framkallare – en droppflaska med mörkklila lock innehållande 7 ml 0,5-procentig (viktprocent) dimetylaminocinnamaldehyd i 1M-saltsyra.
- ID0802M** 0,5M-natriumhydroxid – en platt flaska med vitt lock innehållande 6 ml 0,5M NaOH (tillräckligt för 600 gramlysissscreeningtester).
- ID0898** Paddelpastetter – förpackning med 60.  
Instruktionsbroschyr

### Material som behövs men som inte ingår

Rena objektglas.

Sterila engångsinokuleringsöglor för 10 µl i plast.

Positiva och negativa kvalitetskontrollorganismer.

Sax

### Varningar!

Denna produkt är endast avsedd för diagnostiskt *in vitro*-bruk.

Använd inte O.B.I.S.-campyreagenserna efter det angivna sista användningsdatumet.

DMAC-framkallaren består av en svag syra som färgar huden. 0,5M-natriumhydroxidlösningen är korrosiv och kan orsaka brännskador.

Andas inte in ångorna. Undvik kontakt med hud och ögon. Skölj omedelbart under rikligt med rinnande vatten och kontakta läkare om vätskan kommer i kontakt med ögonen. Tvätta omedelbart med rikligt med vatten i händelse av hudkontakt och sök läkarhjälp. Använd lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd.

Begagnade testkort och inokuleringsöglor ska kasseras såsom biologiskt riskavfall. Avfallet ska antingen förbrännas eller autoklaveras vid en temperatur på 121°C i minst 15 minuter.

*Campylobacter* är patogener. En låg infektiös dos kan vålla gastroenterit med potentiellt allvarliga komplikationer. Vidtag lämpiga säkerhetsåtgärder vid hantering av potentiellt kontaminerade prover.

### Förvaring och öppning

O.B.I.S.-campykitet måste förvaras vid en temperatur på 2-8°C. Påsarna ska nå rumstemperatur före användning för att förebygga kondensbildning på testkorten.

Öppna påsarna genom att klippa i skåran mellan ändförslutningen och klämöppningen.

Ta ut det antal testkort som behövs och återförslut sedan påsen. Använd inom 60 minuter.

Klipp isär kortet om alla tester på kortet inte behövs och lägg sedan tillbaka den del som inte ska användas i påsen. Lägg inte tillbaka begagnade testkort i påsen.

Fällning uppkommer efter långtidsförvaring av natriumhydroxiden – den inverkar inte på prestanda. Använd alltid en steril ögla. Kassera vid uppenbar kontaminering.

### Kvalitetskontrollförfarande

Tillämpa nedanstående förfarande varje gång kitet används:

#### Gramlystest

1. **Positiv kontroll** – Använd en känd gramnegativ (gramlysispositiv) organism såsom *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Tillämpa den metod som framgår av testförfarandet.
2. **Positiv kontroll** – Använd en känd grampositiv (gramlysisnegativ) organism såsom *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Tillämpa den metod som framgår av testförfarandet.



## L-ALA-test

1. **Positiv kontroll** – använd en känd L-ALA-positiv organism såsom *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Tillämpa den metod som framgår av testförfarandet. En mörklila färg ska uppkomma runt kolonimaterialet inom 20 sekunder.
2. **Negativ kontroll** – använd en känd L-ALA-negativ organism såsom *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Tillämpa den metod som framgår av testförfarandet. En mörklila färg ska inte uppkomma inom 20 sekunder.

## Prov

Testet är avsett för användning från renhetsplattor såsom Columbiablodagar. Primära isoleringsmedia ska inte användas eftersom kolonierna kan vara för små eller för få för att ett effektivt test ska kunna utföras. Välj kolonier med typisk *campylobactermorfologi* från selektiva *campylobacterisoleringsmedia* och stryk ut på Columbiablodagar. Inkubera i 48 timmar i en mikroaerobisk atmosfär och genomför sedan O.B.I.S.-testet.

## Testförfarande och tolkning av resultaten

### Gramlystest

1. Ta 10 µl 0,5M natriumhydroxidlösning med en ögla (flaska med platt vitt lock) och placera lösningen på ett rent objektglas.
2. Ta en liten mängd material från en renhetsplatta med en steril ögla.
3. Blanda ner lösningen i NaOH-lösningen på plattan i upp till en minut.
4. Lyft försiktigt upp öglan från blandningen då och då för att kontrollera om det finns några 'strängar' mellan öglan och blandningen.
5. Notera resultatet:
  - Ett positivt resultat karakteriseras av ett visköst utseende hos blandningen och förekomsten av DNA-strängen. Det indikerar att organismen är **gramnegativ**.
  - Ett negativt resultat karakteriseras av uppkomsten av en celluppslamning utan sträng och indikerar att organismen är **grampositiv**.

Testet kan även utföras med 0,5M kaliumhydroxidlösning (KOH). Alternativt kan traditionell gramfärgning användas för att fastställa organismens gramstatus.

## L-ALA-test

När organismen har identifierats som gramnegativ kan L-ALA-delen av testet utföras.

1. Ta ut ett testkort ur påsen.
2. Överför motsvarigheten till en koloni med en diameter på 5x1 mm från en renhetsplatta till testområdet med paddeländan på en ny plastpastett.
3. Stryk ut provet över reaktionszonen (inuti en cirkel) på ett testkort.
4. Dispensera en droppe O.B.I.S.-campybuffert (droppflaska med vitt lock) i var och en av de inokulerade reaktionszonerna.
5. Vänta i 30 sekunder.

- Dispensera en droppe O.B.I.S. DMAC-framkallare (mörklila lock) i var och en av de inokulerade reaktionszonerna.
- Uppträdandet av en mörklila färg kring det ursprungliga kolonimaterialet inom 20 sekunder innebär en positiv L-ALA-reaktion. En positiv reaktion indikerar att organismen **inte** är någon av arterna *campylobacter*, *helikobacter* eller *arkebacter*.

Om ingen färg uppkommer kring det ursprungliga kolonimaterialet inom 20 sekunder är reaktionen negativ. En negativ reaktion indikerar att organismen kan vara av någon av arterna *campylobacter*, *helikobacter* eller *arkebacter*.

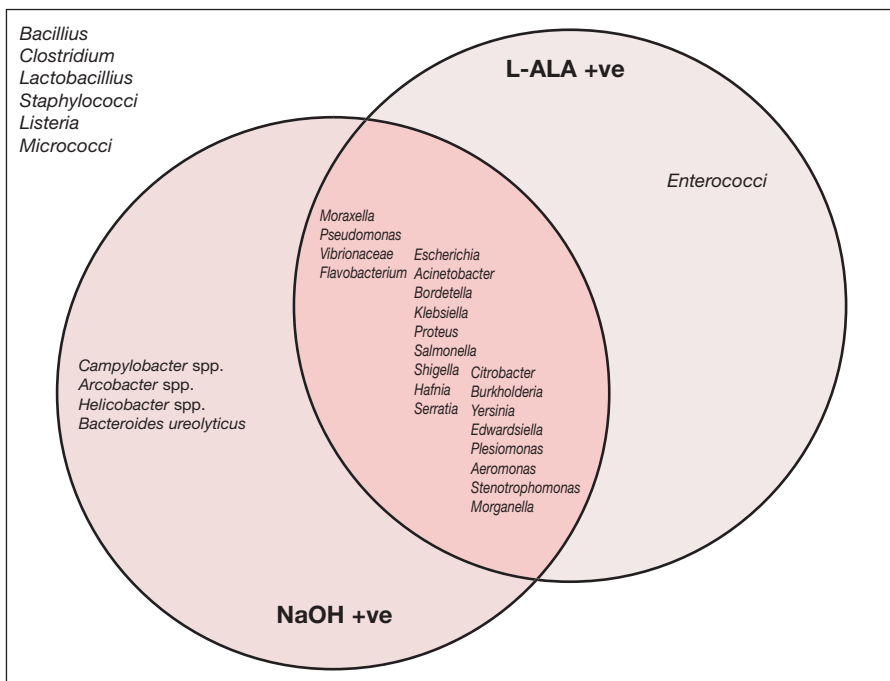
## Tolkningsmatris

Typiska reaktioner:

Organism	0,5M NaOH	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (dvs. gramneg)	-
Grampositiva	- (dvs. grampos)	-
Andra gramnegativa	+ (dvs. Gramneg)	+

## Venndiagram

Venndiagrammet visar hur *campylobacter* och *campylobacterrelaterade* organismer kan differentieras från andra vanliga bakterier med gram-lysis och L-ALA-tester av O.B.I.S. campy.



## Testens begränsningar

O.B.I.S campy är avsedd för detektering av L-alanylaminopeptidas i gramnegativa organismer. Produkten kan användas för presumtiv identifiering av *campylobacter* och relaterade organismer från rena kulturer.

Reaktionen med O.B.I.S. campy L-ALA-testet är en markerare för enzymaktivitet och atypiska stammar kan uppträda ibland. *Bacteroides ureolyticus* kan ge samma reaktioner som *campylobacterarter*. Deras koloniella morfologi och anaerobiosi bidrar emellertid till differentieringen.

Med tiden kan DMAC-framkallare förorsaka en lätt rosa reaktion med campybufferten även i negativa prover. Denna reaktion är emellertid lätt att differentiera från den klara, mörklila reaktion som uppkommer runt kolonimaterialet i ett positivt prov.

Använd inte nikromspatlar för inokuleringen eftersom materialet kan störa testet.

## Prestanda

Vid en intern studie testades 46 *campylobacterarter* och 6 *arkebacterarter*. Samtliga gav upphov till en gramnegativ, L-ALA-negativ reaktion. 252 andra arter (icke-*campylobacter*, -*arkebacter* eller -*helicobacter*) testades. Endast en organism gav ett resultat som liknade det för *campylobacter* vilket berodde på en atypisk gramlysis reaktion. Detta innebar en känslighet och specificitet på 100 % respektive 99,6 %(3).

## Σύστημα βιοχημικής ταυτοποίησης καμπυλοβακτηρίων της Oxoid (O.B.I.S.)

### Προοριζόμενη χρήση

Το σύστημα βιοχημικής ταυτοποίησης καμπυλοβακτηρίων (campy) της Oxoid (O.B.I.S.) είναι μια απλή και ταχεία χρωματομετρική ανάλυση για την ανίχνευση της L-αλανυλοαμινοπεπτιδάσης. Έχει σχεδιαστεί για τη διάκριση των ειδών *Campylobacter*, *Helicobacter* και *Arcobacter* από άλλους αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς, και ενσωματώνει μια ανάλυση λύσης κατά Gram, η οποία καταδεικνύει την κατάσταση κατά Gram.

### Αρχή της ανάλυσης

Η ανάλυση O.B.I.S. campy διακρίνει τα είδη *Campylobacter*, *Helicobacter* και *Arcobacter* από όλους τους άλλους αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς<sup>(1)</sup>. Αντίθετα από τους άλλους αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς, τα *Campylobacteraceae* δεν διαθέτουν το ένζυμο L-αλανυλοαμινοπεπτιδάση (L-ALA). Η ανάλυση O.B.I.S. campy ενσωματώνει μια ταχεία ανάλυση για την ανίχνευση αυτού του ενζύμου και ένα αντιδραστήριο λύσης κατά Gram, για ταχύ προσδιορισμό της κατάστασης κατά Gram.

Αρχικά, θα πρέπει να διεξαχθεί μία ανάλυση λύσης κατά Gram (ή χρώσης κατά Gram). Η ανάλυση αυτή διακρίνει μεταξύ των θετικών και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων<sup>(2)</sup>. Η ανάλυση διεξάγεται επάνω σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο. Χρησιμοποιείται υδροξείδιο του νατρίου (0,5 M) για τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram οργανισμών και την απελευθέρωση του DNA. Το DNA σχηματίζει ένα 'κορδόνι' το οποίο είναι εμφανές όταν ο κρίκος ανασηκώνεται από την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου. Η

αντίδραση αυτή δεν εμφανίζεται με τους θετικούς κατά Gram οργανισμούς.

Μετά την ταυτοποίηση του οργανισμού ως αρνητικού κατά Gram, μπορεί να διεξαχθεί η ανάλυση L-ALA.

Κάθε κάρτα αντίδρασης O.B.I.S. έχει εμποτιστεί με το υπόστρωμα της L-ALA (L-αλανυλο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη), σε καθεμία από τις έξι ζώνες αντίδρασης. Ως μέσο εμφάνισης χρώματος χρησιμοποιείται ένα όξινο διάλυμα διμεθυλαμινοκινναμaldeυδης (DMAC). Εάν το υπόστρωμα υδρολυθεί από τον οργανισμό, η ελεύθερη 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη θα συνδυαστεί με το διάλυμα εμφάνισης και θα σχηματίσει μια μωβ βάση Schiff.

### **Συστατικά του κιτ O.B.I.S. campy (ID0800M)**

Κάθε κιτ περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια, με υλικό που επαρκεί για 60 αναλύσεις:

- ID0803M: Κάρτες ανάλυσης O.B.I.S. campy – μία επανασφραγιζόμενη θήκη που περιέχει 10 κάρτες, με έξι ζώνες αντίδρασης η καθεμία.
- ID0804M: Ρυθμιστικό διάλυμα O.B.I.S. campy – ένα σταγονομετρικό φιαλίδιο με λευκό πάμα που περιέχει 7 ml διαλύματος.
- ID0221M: Διάλυμα εμφάνισης DMAC O.B.I.S. - ένα σταγονομετρικό φιαλίδιο με μωβ πάμα που περιέχει 7 ml διμεθυλαμινοκινναμaldeυδης 0,5% κ.β. σε υδροχλωρικό οξύ 1 M.

- ID0802M: Υδροξείδιο του νατρίου 0,5 M – ένα φιαλίδιο με επίπεδο λευκό πώμα που περιέχει 6 ml NaOH 0,5 M (επαρκεί για 600 αναλύσεις διαλογής για λύση κατά Gram).
- ID0898: Σιφόνια ανάδευσης – συσκευασία των 60.
- Φύλλο οδηγιών.

### **Απαιτούμενα υλικά που δεν περιλαμβάνονται**

Καθαρές γυάλινες αντικειμενοφόροι.

Αποστειρωμένοι αναλώσιμοι κρίκοι ενοφθαλμισμού των 10 μl.

Οργανισμοί θετικού και αρνητικού ελέγχου.

Ψαλίδι

## Προφυλάξεις

Το προϊόν αυτό προορίζεται αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια O.B.I.S. campy μετά την παρέλευση της αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης.

Το διάλυμα εμφάνισης DMAC περιέχει ένα ασθενές οξύ και ενδέχεται να χρωματίσει το δέρμα. Το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,5 M είναι διαβρωτικό και ενδέχεται να προκαλέσει εγκαύματα.

Μην εισπνέετε τις αναθυμιάσεις/τους ατμούς. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική βοήθεια. Μετά από επαφή με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική βοήθεια. Να φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και εξοπλισμό προστασίας ματιών/προσώπου.

Οι χρησιμοποιημένες κάρτες ανάλυσης και οι κρίκοι ενοφθαλμισμού θα πρέπει να απορρίπτονται ως βιολογικώς επικίνδυνα απορρίμματα. Τα απορρίμματα αυτά θα πρέπει να αποτεφρώνονται ή να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C επί τουλάχιστον 15 λεπτά.

Τα είδη *Campylobacter* είναι παθογόνα. Ακόμα και μια χαμηλή λοιμογόνος δόση μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα με δυνητικά σοβαρές επιπλοκές. Λάβετε τις κατάλληλες προφυλάξεις κατά το χειρισμό δυνητικά μολυσμένων δειγμάτων.

## Φύλαξη και άνοιγμα

Το κιτ O.B.I.S. campy πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C. Πριν από τη χρήση, αφήστε τις θήκες να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποτρέψετε τη συμπύκνωση υδρατμών επάνω στις κάρτες ανάλυσης.

Ανοίξτε τις θήκες κόβοντας την εγκοπή μεταξύ του ακραίου σφραγίσματος και του ανοίγματος του κλιπ ασφάλισης.

Αφαιρέστε όσες κάρτες ανάλυσης απαιτούνται και σφραγίστε ξανά τη θήκη. Χρησιμοποιήστε τις εντός διαστήματος 60 λεπτών.

Εάν απαιτούνται λιγότερες αναλύσεις από το συνολικό αριθμό αναλύσεων κάθε κάρτας, κόψτε την κάρτα και επιστρέψτε το αχρησιμοποίητο τμήμα στη θήκη. Μην επιστρέψετε χρησιμοποιημένες κάρτες ανάλυσης στη θήκη.

Το υδροξείδιο του νατρίου θα εμφανίσει κατακρήμνιση μετά από παρατεταμένη φύλαξη – αυτό δεν επηρεάζει την απόδοση. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται πάντοτε αποστειρωμένος κρίκος. Απορρίψτε τον κρίκο εάν υπάρχει εμφανής μόλυνση.



## Διαδικασία ελέγχου ποιότητας

Θα πρέπει να ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία κάθε φορά που χρησιμοποιείται το κιτ:

### Ανάλυση λύσης κατά Gram

1. **Θετικός έλεγχος** – Χρησιμοποιήστε ένα γνωστό αρνητικό κατά Gram (θετικό σε λύση κατά Gram) οργανισμό, όπως το *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Ακολουθήστε τη μέθοδο που περιγράφεται στη διαδικασία της ανάλυσης.
2. **Αρνητικός έλεγχος** – Χρησιμοποιήστε ένα γνωστό θετικό κατά Gram (αρνητικό σε λύση κατά Gram) οργανισμό, όπως το *Bacillus cereus* ATCC®11778™. Ακολουθήστε τη μέθοδο που περιγράφεται στη διαδικασία της ανάλυσης.

### Ανάλυση L-ALA

1. **Θετικός έλεγχος** – χρησιμοποιήστε ένα γνωστό θετικό για L-ALA οργανισμό, όπως η *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™. Ακολουθήστε τη μέθοδο που περιγράφεται στη διαδικασία της ανάλυσης. Βεβαιωθείτε ότι εμφανίζεται μωβ χρώμα γύρω από το υλικό της αποικίας εντός 20 δευτερολέπτων.
2. **Αρνητικός έλεγχος** – χρησιμοποιήστε ένα γνωστό αρνητικό για L-ALA οργανισμό, όπως το *Campylobacter jejuni* ATCC®33291™. Ακολουθήστε τη μέθοδο που περιγράφεται στη διαδικασία της ανάλυσης. Βεβαιωθείτε ότι δεν εμφανίζεται μωβ χρώμα εντός 20 δευτερολέπτων.

## Δείγματα

Η ανάλυση έχει σχεδιαστεί για χρήση από τρυβλία καλλιέργειας, όπως το αιματούχο άγαρ Columbia. Το αρχικό θρεπτικό υλικό απομόνωσης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται, καθώς οι αποικίες ενδέχεται να είναι πολύ μικρές ή πολύ λίγες για να διεξαχθεί μια ανάλυση με επιτυχία. Συλλέξτε τις αποικίες που εμφανίζουν τυπική μορφολογία *Campylobacter* από το εκλεκτικό για *Campylobacter* θρεπτικό υλικό απομόνωσης και επιστρώστε σε αιματούχο άγαρ Columbia. Επωάστε σε μικροαερόβια ατμόσφαιρα επί 48 ώρες και, στη συνέχεια, εκτελέστε την ανάλυση O.B.I.S.

## Διαδικασία της ανάλυσης και ερμηνία των αποτελεσμάτων

### Ανάλυση λύσης κατά Gram

1. Αφαιρέστε μια ποσότητα 10 μl, που αντιστοιχεί σε ένα γεμάτο κρίκο, από το διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,5 M (φιαλίδιο με επίπεδο λευκό πάμα) και τοποθετήστε την σε μια καθαρή, γυάλινη αντικειμενοφόρο.
2. Χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο κρίκο, συλλέξτε μια μικρή ποσότητα υλικού από ένα τρυβλίο καλλιέργειας.
3. Αναμείξτε το δείγμα με το NaOH επάνω στην αντικειμενοφόρο, επί έως και ένα λεπτό.
4. Κατά διαστήματα, ανασηκώστε προσεκτικά τον κρίκο από το μείγμα, προκειμένου να ελέγξετε για την παρουσία ενός 'κορδονιού' μεταξύ του κρίκου και του μείγματος.
5. Καταγράψτε το αποτέλεσμα:

- Ένα θετικό αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται από ένα παχύρρευστο μείγμα και από την παρουσία του ‘κορδονιού’ DNA. Αυτό υποδεικνύει ότι ο οργανισμός είναι **αρνητικός κατά Gram**.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ενός εναιωρήματος κυττάρων χωρίς ‘κορδόνι’ και υποδεικνύει ότι ο οργανισμός είναι **θετικός κατά Gram**.

Η ανάλυση αυτή μπορεί επίσης να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (KOH) 0,5 M. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια τυπική χρώση κατά Gram, προκειμένου να εξακριβωθεί η κατάσταση κατά Gram του οργανισμού.

## Ανάλυση L-ALA

Μετά την ταυτοποίηση του οργανισμού ως αρνητικού κατά Gram, μπορεί να διεξαχθεί το τμήμα της ανάλυσης που αφορά την L-ALA.

1. Αφαιρέστε μία από τις κάρτες ανάλυσης από τη θήκη.
2. Χρησιμοποιώντας το άκρο ανάδευσης ενός αχρησιμοποίητου πλαστικού σιφωνίου ανάδευσης, μεταφέρετε ένα τμήμα των αποικιών που αντιστοιχεί σε διάμετρο 5 x 1 mm από ένα τρυβλίο καλλιέργειας στην περιοχή εξέτασης.
3. Απλώστε το δείγμα κατά μήκος της ζώνης αντίδρασης (μέσα σε ένα κύκλο) της κάρτας ανάλυσης.
4. Τοποθετήστε μία σταγόνα του ρυθμιστικού διαλύματος O.B.I.S. campy (σταγονομετρικό φιαλίδιο με λευκό πάμα) επάνω σε καθεμία από τις ενοφθαλμισμένες ζώνες αντίδρασης.
5. Περιμένετε επί 30 δευτερόλεπτα.
6. Τοποθετήστε μία σταγόνα του διαλύματος εμφάνισης DMAC O.B.I.S. (μωβ πάμα) επάνω σε καθεμία από τις ενοφθαλμισμένες ζώνες αντίδρασης.
7. Η εμφάνιση μωβ χρώματος γύρω από το υλικό της αρχικής αποικίας εντός 20 δευτερολέπτων αποτελεί θετική αντίδραση για L-ALA. Η θετική αντίδραση υποδεικνύει ότι ο οργανισμός **δεν** ανήκει στα είδη *Campylobacter*, *Helicobacter* ή *Arcobacter*.

Εάν δεν εμφανιστεί χρώμα γύρω από το υλικό της αρχικής αποικίας εντός 20 δευτερολέπτων, αυτό αποτελεί αρνητική αντίδραση. Η αρνητική αντίδραση υποδεικνύει ότι ο οργανισμός ανήκει υποθετικά στα είδη *Campylobacter*, *Helicobacter* ή *Arcobacter*.

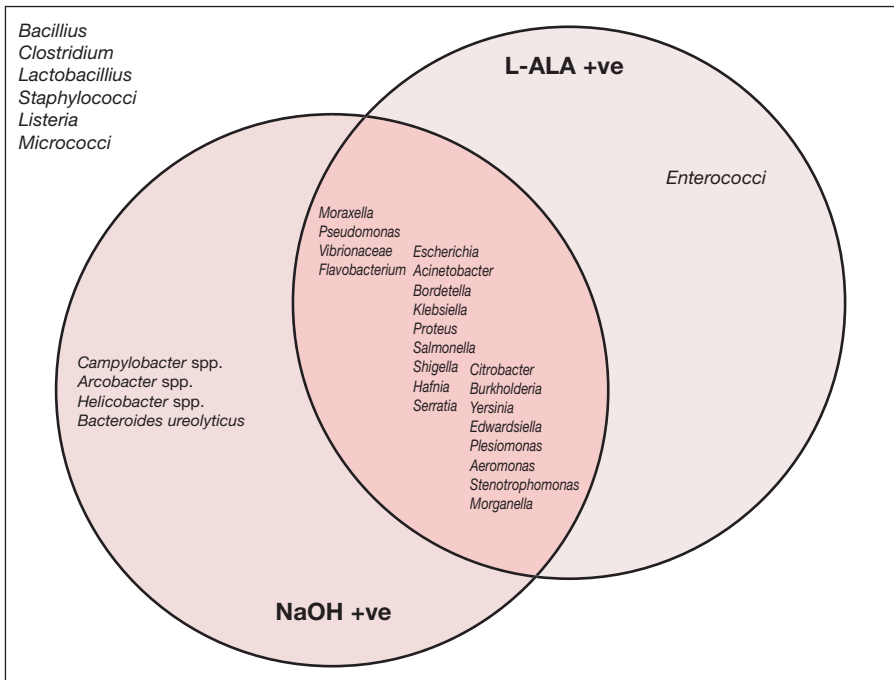
## Διάγραμμα ερμηνείας

Τυπικές αντιδράσεις:

Οργανισμοί	NaOH 0,5M	L-ALA
<i>Campylobacteriaceae</i>	+ (δηλ. αρνητικοί κατά Gram)	-
Θετικοί κατά Gram	- (δηλ. θετικοί κατά Gram)	-
Άλλοι αρνητικοί κατά Gram	+ (δηλ. αρνητικοί κατά Gram)	+

## Διάγραμμα Venn

Το διάγραμμα Venn καταδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα είδη *Campylobacter* και οι οργανισμοί που σχετίζονται με τα είδη *Campylobacter* μπορούν να διακριθούν από άλλα κοινά βακτήρια, χρησιμοποιώντας τη λύση κατά Gram και τις αναλύσεις για L-ALA του κιτ O.B.I.S. campy.



## Περιορισμοί της ανάλυσης

Το κιτ O.B.I.S campy προορίζεται για την ανίχνευση της L-αλανυλοαμινοπεπτιδάσης σε αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην υποθετική ταυτοποίηση ειδών *Campylobacter* και σχετικών οργανισμών από καθαρές καλλιέργειες.

Η αντίδραση με την ανάλυση L-ALA του κιτ O.B.I.S. campy αποτελεί ένα δείκτη της ενζυμικής δραστηριότητας και, περιστασιακά, ενδέχεται να προκύψουν άτυπα στελέχη. Το *Bacteroides ureolyticus* μπορεί να δώσει τις ίδιες αντιδράσεις με τα είδη *Campylobacter*. Ωστόσο, η μορφολογία των αποικιών και η αναερόβιωση βοηθούν στη διαφοροποίηση.

Με την πάροδο του χρόνου, το διάλυμα εμφάνισης DMAC ενδέχεται να δώσει μια ελαφρά ροζ αντίδραση με το ρυθμιστικό διάλυμα των καμπυλοβακτηρίων (campy), ακόμα και στα αρνητικά δείγματα. Ωστόσο, η αντίδραση αυτή εύκολα διαφοροποιείται από τη σαφώς μωβ αντίδραση που εμφανίζεται γύρω από το υλικό της αποικίας στα θετικά δείγματα.

Μη χρησιμοποιείτε κρίκους από σύρμα nichrome για τον ενοφθαλμισμό των καρτών, καθώς το υλικό αυτό ενδέχεται να επηρεάσει την ανάλυση.

## Απόδοση

Σε μια εσωτερική μελέτη, αναλύθηκαν 46 είδη *Campylobacter* και 6 είδη *Arcobacter*. Όλα έδωσαν αρνητική κατά Gram και αρνητική για L-ALA αντίδραση. Αναλύθηκαν επίσης 252 άλλα είδη (που δεν ήταν *Campylobacter*, *Arcobacter* ή *Helicobacter*). Μόνον ένας οργανισμός έδωσε αποτέλεσμα παρόμοιο με τα *Campylobacter*, και αυτό οφειλόταν σε μια άτυπη αντίδραση λύσης κατά Gram. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ευαισθησία και η ειδικότητα να δίνουν τιμές 100% και 99,6% αντίστοιχα<sup>(3)</sup>.

## References

1. Hoosain, N. and Lastovica A. J. (2005). Evaluation of the Oxid Biochemical Identification System (O.B.I.S.) for the differentiation of *Campylobacter* and *Arcobacter* from other Gram-negative organisms. In: Abstracts of CHRO 2005. 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Sept 4-8, 2005, Gold Coast, Queensland, Australia. Griffith University.
2. Carlone, G. M., Valadez, M. J. and Pickett, M. J. (1982) Methods for distinguishing Gram-positive from Gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 16 (6), 1157-1159.
3. Smith, C. M., Colborne, N. R., Stephens, P .J. and Druggan, P. (2006) a simple and rapid biochemical screening test for the differentiation of *Campylobacter* spp. from other contaminating micro-organisms. In: Abstracts of Emerging *Campylobacter* spp. in the food chain, CAMPYCHECK. Feb 8th 2006, Croke Park Conference Centre, Dublin, Ireland.









OXOID, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, England.  
Tel: +44 1256 841144. Fax: +44 1256 463388. Telex: 858793 OXOID G.

