

マイクロダーゼディスク取扱説明書

<細菌検査の迅速・簡便なスクリーニング用試薬>

Cat. No. RML 21-132 (25テスト)

用途

本試薬は菌中のチトクロムCオキシダーゼを検出することによってMicrococcus(マイクロコッカス：陽性)とStaphylococcus(ブドウ球菌：陰性)とを迅速、正確に鑑別するのに使用する。

原理及び経緯

大気中の酸素存在下ではオキシダーゼはオキシダーゼ試薬及びチトクロムCと反応して有色の化合物であるインドフェノールを生成する。

Kovacsが1956年にグラム陰性桿菌の鑑別法としてオキシダーゼ法を最初に報告し、⁽⁴⁾
FallerとSchleiflerがオキシダーゼ試薬を改良してマイクロコッシィとブドウ球菌とを鑑別した。⁽²⁾ また TarrandとGroschelは非酸酵グラム陰性桿菌の検査用に更に改良している。⁽⁶⁾
本マイクロダーゼディスクはFaller及びSchleiflerの改良法にもとずいた検査試薬である。

試薬の組成

Tetramethyl-p-phenylenediamine

DMSO

本試薬以外に準備すべき器具

- (1) Loop Sterilization device
- (2) Inoculating loop 綿棒、検体容器
- (3) 培養器、嫌気性ジャー又はローソクジャー
- (4) 補助培地
- (5) 品質管理用陽性コントロール菌(Micrococcus菌)、
陰性コントロール菌(Staphylococcus aureus)
- (6) アプリケータースティック、ガラススライド又はペトリ皿

〒103 東京都中央区日本橋本町四丁目13番5号

コスモ・バイオ株式会社

臨床検査薬部

TEL (03) 3663-0724

FAX (03) 3663-3428

使用上の注意

- (1) 本試薬は対外診断にのみに使用し、専門の訓練を受けた人が使用する。
- (2) 微生物感染防止の注意が必要であり、検査使用後の材料、容器、培地は滅菌して廃棄する。

試薬の保存

- (1) 本試薬は、遮光して保存する。
- (2) 本試薬は、使用するまで2～8℃の冷暗所に保存する。

試薬の劣化

次のような場合には、試薬を使用してはいけない。

- (1) 暗青色に変色しているとき。
- (2) 有効期限を過ぎているとき。

検体の採取・保存・輸送

- (1) 検体は過熱や冷却を避けて、遅れることなく検査室に輸送すること。
- (2) もし、検査の実施について、何らかの遅れが見込まれる場合は、検体を接種した棉棒を適切な輸送培地、例えば Amie, Stuart に移しかえなければならない。
- (3) 嫌気性菌の検体は、出来るだけ早く輸送する必要があり、出来れば還元済みの培地、のような適当な輸送培地又は、ガス置換したチューブで輸送することが望ましい。
検体の採取、輸送に関するこれ以上の詳細は A S M マニュアル第3版(1980)の "Collection, Handling and Processing of Specimens" の項を参照のこと。

操作法

本検査は、好気性のカタラーゼ陽性グラム陽性球菌について適用する。

- (1) 検体の培養には、血液寒天プレートを使用し、培養時間は24時間以内とする。
15～18時間が適当である。
- (2) 空のペトリ皿、又はガラススライドの上に本マイクロダーゼディスクを置く。ディスクに水を加えてはいけない。
- (3) アプリケーター棒を使って、大きなコロニー1ヶ、又は小さなコロニー数ヶを採取し、先のディスクにこすりつける。
コロニーを採取するとき、培養菌と培地とをかきまぜたり、あるいは培地の表面を採取しないように注意する。
培地をコロニーに付けて採取すると、培地がディスクを変色させることがある。
- (4) 30秒以内にコロニーの変色を観察し、青色から青紫色を呈した場合には、陽性と

する。

品質管理

- (1) 操作法に従って、Micrococcus菌(陽性コントロール)とStaphylococcus aureus (陰性コントロール)を用いるとよい。
- (2) Micrococcus菌は青色から青紫色を呈し、Staphylococcus aureus は呈色しない。

呈色の結果

微生物	結果
• Staphylococcus aureus	無変色(陰性)
• Staphylococcus sciuri以外の Staphylococcus species	無変色(陰性)
• Staphylococcus sciuri	青～青紫色(陽性)
• Micrococcus species	青～青紫色(陽性)

適用の限界

- (1) 検体を24時間以上培養したり、血液寒天プレート以外の培地を使用すると、正しい検査の結果は得られない。従って、検査用のコロニーは、血液寒天プレートから採取した新鮮なものでなければならない。
- (2) コロニー集落の形状だけの観察では、時折誤った結果を与えることがあるので、本検査に先だって、カタラーゼ検査やグラム染色を実施する事が望ましい。
- (3) 本試薬は、簡易なスクリーニング用試薬であって、菌種を同定するためには、本試薬に先立ちあるいは並行して、コアグララーゼ検査、マンニトール検査あるいは他の適切な生化学的手法による検査を実施することが望ましい。
- (4) Staphylococcus sciuriは Staphylococcus speciesの中でミクロダーゼ反応に陽性を示す唯一のものである。従って、もしsciuriが疑わしい場合は、リゾスタフィンテストキット(RML Cat. No. 21-130)を使用するとよい。
なお、S. sciuri は一般には動物から分離されるものと考えられていて、ヒトへの感染に関する検査では日常分離されるものでもなく、また通常では潜性のあるものとも考えられない。
- (5) 本試薬は、Micrococcusと Staphylococcusとの鑑別以外の検査には、使用できない。

参考資料

Cumitech 3, Practical Quality Control Procedures for the Clinical Microbiology Laboratory, ASH, 1976.

Paller, A., Schleifler, K.H., 1981, Modified oxidase and benzidine tests for separation of Staphylococci from Micrococci. J. Clinical Micro., 13: 1031-1035.

Pinegold, S.M., V.J. Martin, and E.G. Scott, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 5th edition, The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1978.

Kovacs, N., 1956, Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London). 178:703.

Lennette, E.H., A. Balows, V.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant, Manual of Clinical Microbiology, 3rd edition, 1980.

Tarrand, F & Groschel, D.H., 1982, Rapid, Modified Oxidase Test for Oxidase-variable Bacterial Isolates. J. Clinical Micro., Oct. pp. 72-774.

(旧社名 丸善石油バイオケミカル㈱)

〒105 東京都港区芝浦1-1-1 (東芝ビルディング)

電話 業務部(ご注文) 03(798)3876

営業1部, 2部 03(798)3882

F A X 03(798)3239

(8 6 0 6 0 1)

USE: This product is recommended for use in qualitative procedures as a method of rapid and accurate differentiation of *Staphylococcus* from *Micrococcus* by the detection of the oxidase enzyme.

HISTORY: The oxidase method was originally described by Kovacs in 1956 as a method of differentiating gram-negative bacilli.¹ In 1981, Faller and Schleifer tested a modification of this oxidase reagent to differentiate *Staphylococcus* from *Micrococcus*.² Kovacs used a 1% aqueous solution of tetramethyl-p-phenylenediamine hydrochloride with sodium ascorbate added to prevent autoxidation. Faller and Schleifer modified Kovacs formula by using tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) in dimethyl sulfoxide (DMSO). Sodium ascorbate was found to have a strong reducing power which resulted in negative results. DMSO provides solubility for the reagent, stability against autoxidation and enhances the permeation of the TMPD into the bacterial cell.⁴ Stanier et al. suggested that the oxidase test is an indirect proof for the presence of a c-type cytochrome. All micrococci contain cytochrome c, whereas all staphylococci with the exception of *Staphylococcus sciuri* lack this type of cytochrome.³

PRINCIPLE: In the presence of atmospheric oxygen, the oxidase enzyme reacts with the oxidase reagent and cytochrome c to form the colored compound, indophenol.

CLASSICAL FORMULA:*

Tetramethyl-p-phenylenediamine.....Q.S. DMSO.....Q.S.

*Adjusted as required to meet performance standards.

PRECAUTIONS: This product is "For In Vitro Diagnostic Use" and should be used by properly trained individuals. Precautions should be taken against the dangers of microbiological hazards by properly sterilizing specimens, containers and media after their use. Directions should be read and followed carefully.

STORAGE: Microdase Disks should be protected from light prior to use. The product should be stored in its original container at 2-8C until used. Do not freeze.

PRODUCT DETERIORATION: This product should not be used if the expiration date has passed, or if the color of the disk has changed to a dark blue color.

PROCEDURE: The usual clinical microbiological equipment is required for procedures involving this product. Other media and equipment required will depend on the identification scheme employed by the microbiologist. Because of the extreme sensitivity of this reagent, the instructions must be followed very carefully.

INSTRUCTIONS: Testing should be performed on aerobic catalase-positive, gram-positive cocci. All colonies should be taken from a Blood Agar plate and growth must be less than 24 hours old, 15-18 hours being optimal. Place the disk in an empty petri dish or on a glass slide. **DO NOT REHYDRATE THE DISK.** Using an applicator stick, inoculate the disk with several colonies (a visible inoculum), being sure not to use a mixed culture. Apply the colonies to the TOP of the disk. Examine for up to 2 minutes and interpret a blue or purple-blue color as positive and no change (white to tan) as being negative.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED: (1) Loop sterilization device, (2) Inoculating loop, swab, collection containers, (3) Incubators, anaerobic jars or candle jars, (4) Supplemental media, (5) Quality control organisms, (6) Applicator sticks, slides or petri dishes.

QUALITY CONTROL: All lot numbers of Microdase Disks have been tested using the following quality control organisms and have been found to be acceptable.

21-132 (7/2)

CONTROL ORGANISM	INCUBATION	RESULTS
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	Aerobic, 2 minutes @ 25-30C	(+) Blue color within 30 seconds
<i>Micrococcus kristinae</i> ATCC 27570	Aerobic, 2 minutes @ 25-30C	(+) Blue color within 2 minutes
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Aerobic, 2 minutes @ 25-30C	(-) No color change at 2 minutes

LIMITATIONS:

1. Test results on organisms older than 24 hours or those taken from media other than Blood Agar are not always accurate. It is therefore recommended that the colonies tested be from a fresh culture from a Blood Agar plate.
2. Colonial morphology is often misleading, it is recommended that a gram stain and a catalase test be performed prior to the performance of a Microdase test, and that the Microdase test be performed prior to or in conjunction with coagulase, mannitol and other biochemical testing for *Staphylococcus* and *Micrococcus* speciation.
3. *Staphylococcus sciuri* is the only *Staphylococcus* species now recognized to give a positive Microdase reaction, it is recommended that if *Staphylococcus sciuri* is suspected, a Lysostaphin test (REMEL #21-130) be performed as a differentiating test. *Staphylococcus sciuri* is generally considered an animal pathogen so when working with human infections it is not a routine isolate and in most cases is not considered a potential pathogen.
4. Microdase is not designed for routine testing for oxidase activity in organisms other than *Staphylococcus* and *Micrococcus*.

BIBLIOGRAPHY:

1. Kovacs, N., *Nature* (London), 178:703, 1956.
2. Faller, A., and K.H. Schleifer, *J. Clin. Microbiol.*, 13:1031-1035, 1981.
3. Stanier, R.Y., M. Doudoroff and E.A. Adelberg, *General Microbiology*, 3rd edition, The Macmillan Press, Ltd., London, 1972.
4. Baker, J.S., *J. Clin. Microbiol.*, 19:875-879, 1984.
5. Cumitech 3, *Practical Quality Control Procedures for the Clinical Microbiology Laboratory*, ASM, 1976.
6. Finegold, S.M., W.J. Martin and E.G. Scott, *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 5th edition, The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1978.
7. Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, Jr. and H.J. Shadomy, *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edition, 1985.

ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection

Revised 12/22/89