

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Automatisatie van respiratoire culturen: implicaties voor kliniek en lab

Author: Sarah Gils
Supervisor: Katrien Lagrou
Date: 19 mei 2015

CLINICAL BOTTOM LINE

De dienst Laboratoriumgeneeskunde plant de installatie van een systeem voor totale laboratoriumautomatisatie (TLA) van de microbiologie. Ik onderzocht de mogelijkheid om respiratoire stalen automatisch te verwerken. Ik voerde op 65 respiratoire stalen Gramkleuring en kweek uit volgens de manuele routinemethode en herhaalde dit na vervloeiing van de stalen met Sputum Liquefying Solution (SLS), een kant-en-klaar gealiquoteerd mucolyticum van Copan. Ook testte ik het effect van SLS-vervloeiing uit op de bepaling van galactomannan in broncho-alveolaire lavagevocht.

Vervloeiing was volledig na verdunning van 1:1 voor 38% van de stalen. Een verdunning van 1:2, 1:3 en 1:4 met SLS was nodig voor vervloeien van respectievelijk 29%, 5% en 28% van de stalen. De aanwezigheid (zeldzaam, +, ++, +++) van polymorfonucleairen, monocyten, monoflores en overheersende kiemen in de Grampreparaten was identiek tussen de wel en niet-voorbehandelde stalen in circa 68 % van de gevallen. Circa 9% van de stalen toonde een discordantie (≥ 2 categorieën verschil) met nagenoeg steeds minder cellen of bacteriën/gisten in de voorbehandelde stalen. De cultuur leverde 111 isolaten op voor de onbehandelde en 109 voor de behandelde stalen. 104 isolaten waren identiek. Zes isolaten werden enkel teruggevonden in de onbehandelde stalen en vier enkel in de behandelde. De groei van 70 van 104 isolaten werd identiek semikwantitatief beoordeeld in de testprotocollen. Zeven discordanties waren gelijk verdeeld over de protocollen. Voorbehandeling van broncho-alveolaire lavagevocht met SLS deed de galactomannanindices spectaculair dalen.

Samenvattend waren de cultuurresultaten na behandeling met SLS evenwaardig aan die zonder SLS, maar de Gramkleuring gebeurt idealiter op het niet-behandelde staal. De voorbehandelingsprocedure is wegens de geringe vervloeiing bij 1:1 verdunning bovendien tamelijk arbeidsintensief. SLS is niet geschikt voor de vervloeiing van broncho-alveolaire lavagevocht voor de bepaling van galactomannan.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

De klinische biologie is in volle evolutie, gedreven door een veeleisende gezondheidszorg. Kwaliteit bieden, onder de vorm van efficiënte, effectieve, tijdige, veilige, patiëntgerichte zorg, wordt alsmaar belangrijker. De microbiologie heeft een grote stap vooruit gezet met de komst van de MALDI-TOF MS. Deze heeft het identificeren van kiemen drastisch versneld en vereenvoudigd. Niettemin blijft de cultuur van micro-organismen een arbeidsintensieve labo-analyse met een hoge doorlooptijd. Door onder andere de groeiende behoefte aan screening naar multiresistente kiemen, neemt het aantal aangeboden stalen voor microbiologisch onderzoek toe. Bovendien is geoefend laboratoriumpersoneel moeilijk te vinden en zijn nieuwe aanwervingen budgettair soms onmogelijk.

Contact: Katrien Lagrou

Om met deze toenemende werkdruk en kwaliteitseisen gelijke tred te kunnen houden, implementeerden al verschillende microbiologielaboratoria entautomaten of zijn ze hiermee bezig. Deze toestellen zijn ontworpen om voor een aangeboden staal de geschikte voedingsbodems te selecteren, het staal hierop aan te brengen en het gelijkmatig te verdelen. Ook het labelen en sorteren van de geënte bodems kan door entrobots worden gedaan [Greub et al. 2011]. Het aanbieden van de stalen en bodems aan het toestel blijft hier manueel, alsook het verplaatsen van de geënte bodems in en uit de juiste incubator en het bekijken en interpreteren ervan.

Op de dienst laboratoriumgeneeskunde van UZ Leuven werd besloten tot de aanschaf van een systeem voor totale laboratoriumautomatisatie (TLA). Dit is een meer doorgedreven vorm van automatische microbiologie. Het behoudt de principes van de traditionele bacteriële en fungale cultuur, maar vervangt zoveel mogelijk manuele handelingen door automatische. Er zijn drie grote spelers op de markt: Copan Diagnostics met het WASPLab, bioMérieux met de Full Microbiology Laboratory Automation (FMLA) en BD Kiestra met de Kiestra TLA. Onderling verschillen deze systemen in capaciteit, entsnelheid, inoculatie- en uitstrijkmethode,... kortom eigenschappen die de keuze voor aanschaf van het ene of andere product bepalen. Behalve een entautomaat, hebben deze drie systemen een aantal elementen gemeenschappelijk: een transportband om platen van en naar incubators te vervoeren, digitale camera's om met vastgelegde intervallen beelden te maken van de bodems, automatische incubators en een station voor het digitaal aflezen van de bodems. Gepatenteerde software stuurt ten slotte deze modules aan en verzekert de connectie met het laboratoriuminformatiesysteem [Bourbeau et al. 2013].

Niet alle staaltypes lenen zich tot automatische enting. Het aanbrengen van het staal op de voedingsbodems gebeurt ofwel met een metalen entlus, die tussen twee stalen gesteriliseerd wordt door verhitting, ofwel met behulp van een automatische pipet met een wegwerptip. Het uitstrijken gebeurt met de metalen entlus (WASP, Copan; Innova, Becton-Dickinson) of met een magnetisch rollend balletje (Inoqula, BD Kiestra) of met een soort plastieken kam (Previ-Isola, bioMérieux). Al deze werkwijzen vereisen dat het staal vloeibaar en homogeen is.

Deze voorwaarde heeft de ontwikkeling gedreven van collectietubes met een vloeibaar bewaarmedium, waarin aerobe, anaerobe, moeilijk groeiende bacteriën, gisten en schimmels overleven. De eerste dergelijke tube was de ESwab van Copan. Het staal wordt afgenomen met een wisser die daarna wordt afgebroken en in het vloeibare Amiesmedium achtergelaten. Eventuele micro-organismen kunnen zo van de wisser loskomen en oplost raken in de vloeibare fase. Dit laat toe dat niet de wisser gebruikt moet worden om het staal op voedingsbodems uit te platen, maar dat de vloeistof, met daarin de gezochte kiemen kan worden aangebracht en uitgestreken. Op deze manier kunnen niet alleen urinestalen door een automaat geënt worden, maar ook stalen afgenomen met een ESwab, zoals screeningsstalen voor MRSA en groep B streptokokken en wondvochten. Welke andere staaltypes nog compatibel gemaakt kunnen worden met enting door een automaat is de volgende vraag die rijst.

Deze CAT behandelt de rol die de automatisatie in het microbiologisch labo kan spelen voor de cultuur van respiratoire stalen. Deze stalen hebben een zeer variabele viscositeit, zijn vaak niet homogeen en soms van een erg laag volume. Daarnaast bereiken ze het labo in de meest uiteenlopende recipiënten.

Al sinds de jaren '60 wordt het reagens van Cleland, oftewel dithiothreitol (DTT), een krachtige reductor van disulfidebindingen, gebruikt als mucolyticum. In een studie van Hammerschlag kon de superioriteit van DTT-gelyseerde ten opzichte van niet-gelyseerde respiratoire stalen van mucoviscidosepatiënten in het detecteren van gisten en bacteriën echter niet worden aangetoond [Hammerschlag et al. 1980]. Wel werd de kwantitatieve kweek van de taaie sputa beduidend gemakkelijker na mucolyse van de stalen met DTT. Baxter observeerde in haar studie een verhoogde gevoeligheid voor de kweek van *Aspergillus fumigatus* uit de sputa van

mucoviscidosepatiënten wanneer de stalen behalve met DTT ook met sonicatie werden voorbehandeld [Baxter et al. 2011]. DTT is in geconcentreerde, te reconstitueren vorm verkrijgbaar onder verschillende merknamen (Sputasol, Digest-EUR, MucoGest). Copan is met de Sputum Liquefying solution (SLS) de eerste om DTT, klaar voor gebruik aan te bieden in tubes met 0,5 of 1 ml SLS. In deze CAT bekijk ik wat het effect is van voorbehandeling met SLS van respiratoire stalen op de resultaten van de Gramkleuring en de bacteriële en fungale kweek. Daarnaast evalueer ik het gebruiksgemak van SLS en de efficiëntie waarmee het respiratoire stalen vervloeit. Tot slot bespreek ik het effect van SLS op de galactomannanbepaling in broncho-alveolaire lavagevocht (BAL-vocht).

QUESTION(S)

- 1) Welke rol kan SLS spelen in de automatisatie van de respiratoire culturen?
- 2) Zijn BAL-vocht, voorbehandeld met SLS geschikt voor de bepaling van galactomannan?

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "automation, microbiology", "automation, bacteriology", "dithiothreitol, mycobacteria, culture", "respiratory, culture", "galactomannan", "aspergillosis, invasive pulmonary", "sonication, sputum".*
- 2) *ECCMID online Lecture Library: "Sputum Liquefying solution", "dithiothreitol", "automation, respiratory", "sputum, culture"*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*
De Pauw B et al. Revises definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008 June 15;46(12):1812-1821.
- 2) *Reviews*
Bourbeau PP, Ledeboer NA. Automation in clinical bacteriology. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1658-1665.

Buchan BW, Ledeboer NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct;27(4):783-822.

Greub G, Prod'homme G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? Clin Microbiol Infect. 2011 May;17(5):655-660.
- 3) *Original Articles*
Baxter CG, Jones AM, Webb K, Denning DW. Homogenisation of cystic fibrosis sputum by sonication – An essential step for *Aspergillus* PCR. J Microbiol Meth. 2011 Jan 21;85:75-81.

Hammerschlag MR, Harding L, Maccone A, Smith AL, Goldmann DA. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. J Clin Microbiol. 1980 Jun;11(6):552-557.

Nebbad-Lechani B, Emirian A, Maillebuau F, Mahjoub N, Fihman V, Legrand P, Decousser JW. New procedure to reduce the time and cost of broncho-pulmonary specimen management using the Previ Isola® automated inoculation system. J Microbiol Meth. 2013 Oct 20;95:384-388.

Prattes J. Bronchoalveolar lavage fluid sample pretreatment with Sputasol® significantly reduces galactomannan levels. J Infect. 2015 May;70(5):541-552.
- 4) *Reference Works, Handbooks and Databases*
Garcia L et al. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3th ed. 2007. Chapter 3.2.1 Gram Stain, 3.11.2 Lower Respiratory Tract Cultures.

5) Posters, "grey literature", presentations

Bielli A, Berlingeri A, Mirone E, Landini MP. Evaluation of Copan SL-Solution for pre-treatment of lower respiratory samples for bacterial culture inoculation on the automated Walk Away Specimen Processor (WASP) [Abstract]. In: 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2011 May 7-10; Milan. 2011. R2467.

Boelens J, De Cooman L, Leroux-Roels I, Claeys G. Evaluation of sputum-liquefying solution for pre-treatment of respiratory samples [Abstract]. In: 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2013 April 27-30; Berlin. 2013 April 27. R2752.

Boelens J, Leroux-Roels I, Claeys G. Implementation of sputum liquefying solution (SLS, Copan Italia) for use on an automated streaking robot in a routine microbiology lab [Abstract]. In: 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2014 May 10-13; Barcelona. 2014 May 10. R337.

Buchan B, Mackey T, Beck E, Connolly J, Ledeboer N. Evaluation of Copan SnotBuster™ for improved sputum culture results [Abstract]. In: 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2014 May 10-13; Barcelona. 2014 May 11. O074.

Cocquerelle V, Koebel C, Stempfer R, Graeffly C, Jehl F, Jaulhac B. Comparison of pre-treatment of sputum and endotracheal aspirate samples with SL-Solution (Copan®) or Digest-EUR (Eurobio®) [Abstract]. In: 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2012 March 31-Apr 3; London. 2012 March 31. R2651.

Copan SLsolution [package insert]. Brescia: Copan Italia S.p.A. 2011.

Doyle LJ, Hall GS, Boss AC, Harrington SM. Analysis of the Copan SL Solution for liquefaction of respiratory specimens prior to Gram stain and culture [Poster]. In: 112th General Meeting of the American Society for Microbiology; 2012 June 16-19; San Francisco. 2012 June 17. C-3124.

Silbert S, Knight S, Fenton L, Widen R. Evaluation of the Copan SL Solution to improve sputum culture [Poster]. In: 112th General Meeting of the American Society for Microbiology; 2012 June 16-19; San Francisco. 2012 June 17. C-735.

Young C, Cullen K, LeBar W, Newton D. Use of COPAN SL Solution for processing sputum from patients with and without cystic fibrosis [Poster]. In: 110th General Meeting of the American Society for Microbiology; 2010 May 23-27; San Diego. 2010 May 24. C-625.

APPRAISAL

Methoden

De huidige werkwijze voor de cultuur van sputumstalen, bronchusaspiraten, BAL-vochten en stalen van mucoviscidosepatiënten is volledig manueel. Sputumstalen die tijdens de werkuren (tussen 8u30 en 17u30) aankomen op de sputumwerkpost, worden meteen geënt. Stalen die buiten die uren aankomen, worden in de koelkast bewaard en de volgende ochtend geënt. De enting is een vierkwadrantsenting en gebeurt met een metalen öse, die tussen twee stalen wordt uitgevlamd. Alle stalen worden rechtstreeks geënt op de volgende media:

Bloedagar met een optochineschijfje op de kruising van het eerste en tweede kwadrant,

Mannitol-saltagar (MSA),

McConkeyagar (MC),

Haemophilusagar met een chlooramfenicolschijfje in het eerste kwadrant.

Als de kweek van gisten en schimmels werd aangevraagd, wordt ook een Sabouraudbuis geënt en indien het een BAL betreft, ook een chromogene *Candida*-agar (C-plaat). Stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten worden daarnaast altijd geënt op een selectieve *Burkholderia cepacia*-agar (BUCE). Bij een aanvraag voor kweken van *Legionella* wordt een Buffered Charcoal Yeast Extractagar (BCYE) geënt. Alle stalen worden ten slotte met de öse

uitgestreken op een draagglaasje voor de Gramkleuring. De bloed-, Haemophilus- en Legionella-agars staan ter incubatie bij 35°C in een CO₂-broedstoof. De MSA's, MC's, BUCE's en C-platen gaan een incubator in met een gewone atmosfeer. De Sabourauds staan bij gewone atmosfeer eerst één nacht in een broedstoof bij 42°C, daarna gaan ze tot 21 dagen na de enting een incubator van 30°C in.

Na incubatie tijdens de nacht worden alle voedingsbodems afgelezen. Mogelijke pathogenen worden geïdentificeerd en zo nodig wordt een antibiogram uitgevoerd volgens de instructies in onze SOP's (Bijlage 1). BCYE's worden gedurende tien dagen in de incubator geplaatst en dagelijks afgelezen. Sabourauds worden dagelijks nagekeken op groei van gisten en schimmels. Alle schimmels worden geïdentificeerd en zo nodig wordt een gevoeligheidsbepaling uitgevoerd. Identificatie en gevoeligheidsbepaling voor gisten gebeurt volgens noodzaak, zoals beschreven in onze procedures (Bijlage 2). Voor stalen van niet-mucoviscidosepatiënten geldt dat Haemophilus- en bloedagars zonder groei voor een tweede nacht in de incubator gaan en de dag nadien definitief worden afgelezen. Indien deze agars op dag één enkel mondfloor tonen, worden ze bewaard op kamertemperatuur en geëvalueerd in de namiddag. MSA's en MC's van deze patiënten worden eveneens op kamertemperatuur bewaard en 's middags op dag één voor de laatste keer afgelezen.

Alle platen van mucoviscidosepatiënten die geen groei van pathogenen vertonen, gaan voor een tweede nacht de broedstoof in. Tenzij er nog onvoldoende groei is, gebeurt de laatste aflezing op dag twee. BUCE's worden daarna nog vijf dagen bij kamertemperatuur bewaard en dagelijks geëvalueerd.

Om te onderzoeken wat het effect is van de voorbehandeling met SLS van respiratoire stalen op de Gramkleuring en de kweek van bacteriën, gisten en schimmels, vergeleek ik de Gram- en cultuurresultaten van patiëntenstalen met en zonder voorbehandeling. Daartoe verzamelde ik tussen 1 april en 5 mei 65 stalen. De inclusiecriteria waren:

- het staal is een sputumstaal, bronchusaspiraats, BAL-vocht of staal van een patiënt met mucoviscidose,
- het staalvolume bedraagt minstens 0,5 ml.

Exclusiecriteria waren:

- het staal is afgenomen met een ESwab,
- het staal werd langer dan 2u op kamertemperatuur bewaard.

Om te beginnen entte ik de onvoorbehandelde stalen op de gepaste bodems en legde ik de nodige schijfjes, zoals hierboven beschreven. Daarnaast maakte ik een uitstrijkje voor Gramkleuring. Een Sabouraud, C-plaat en BCYE werden enkel geënt indien de cultuur van respectievelijk gisten/schimmels of *Legionella* was aangevraagd. Daarna bereidde ik de stalen voor met SLS volgens de instructies in de bijsluiters (Bijlage 3): met een plastic bolpipet bracht ik, afhankelijk van het beschikbare staalvolume, 0,5 ml of 1 ml staal semikwantitatief over in een tube met respectievelijk 0,5 of 1 ml SLS. Na een incubatie bij kamertemperatuur van minstens 15 minuten en maximum 1 uur, werden de behandelde stalen gedurende 30 seconden opgemengd met de vortex. Door met een automatische pipet 100 µl van het voorbehandelde staal op te zuigen ging ik na of de vervloeiing succesvol was. Indien zonder haperen het volledige volume kon worden opgezogen, was de pipetteerproef succesvol. Voor de eerste 7 stalen die ik analyseerde, heb ik het staal, onafhankelijk van het resultaat van de pipetteerproef, geënt. Omdat 4 van deze 7 stalen na voorbehandeling faalden in de pipetteerproef, heb ik voor de overige stalen het testprotocol licht gewijzigd. Enerzijds heb ik de zeer viskeuze originele stalen die met de bolpipet moeilijk op te zuigen waren, meteen in een verhouding 1:2 verdund met SLS i.p.v. 1:1 (bv. 0,5 ml staal met 1 ml SLS). Anderzijds heb ik de behandelde stalen die faalden in de pipetteerproef verder verdund met telkens 1 ml extra

SLS, opnieuw 15 minuten laten rusten, opgemengd en dit alles herhaald tot het pipetteren lukte. Na volledige vervloeiing entte ik de stalen zoals hierboven beschreven en maakte ik een uitstrijkje voor de Gramkleuring. Deze kleuring gebeurde voor de uitstrijkjes van beide testprotocols, na fixatie in de vlam op de PolyStainer (IUL). Het aflezen van de gegroeide bodems en de kiemidentificaties voerde ik uit zoals het in de routine gebeurt (cfr. supra). Ik beoordeelde de Gramkleuringen van de voorbereide en onvoorbereide stalen, zoals verderop beschreven.

De groei op een agar van mondflora of van een specifieke kiem wordt in de routine steeds semikwantitatief beoordeeld met “zeldzaam”, “+”, “++” of “+++”. Ook de aanwezigheid van cellen en bacteriën of gisten in de Gramkleuring wordt semikwantitatief beoordeeld. Cellen die in respiratoire stalen voorkomen, zijn polymorfonucleaire witte bloedcellen (PN) en mondepitheelcellen (ME). Deze worden in de Gramkleuring microscopisch opgespoord bij een lage vergroting (een 10X objectief met een 10X oculair). Bacteriën worden in de Gramkleuring opgespoord met een olie-immersielens, bij sterke vergroting (een 100X objectief met een 10X oculair). Voor elk staal wordt de aanwezigheid nagegaan van een overheersende, potentieel pathogene soort:

- grampositieve diplokokken (*S. pneumoniae*),
- gramnegatieve diplokokken (*M. catarrhalis*),
- gramnegatieve staven (enterobacteriaceae, non-fermenters, *H. influenzae*),
- stafylokokken,
- coryneforme grampositieve staven,
- gisten.

En ook de aanwezigheid van mondflora (MF), een gevarieerde mengeling van kiemen met bovenstaande morfologie wordt opgespoord. Onze SOP's beschrijven echter niet nauwkeurig welke groei of welk microscopisch beeld overeenkomt met hoeveel plusjes. Voor de beoordeling van de groei en de Gramkleuringen in mijn experiment heb ik me aan volgende criteria gehouden [Garcia et al. 2007].

Groei op een plaat met vierkwadrantsenting:

zeldzaam:	< 10 kolonies,
+:	≥ 10 kolonies, groei tot in het eerste à tweede kwadrant,
++:	groei tot in het tweede à derde kwadrant,
+++:	groei tot in het vierde kwadrant.

Groei op een Sabouraud in een buis:

zeldzaam:	< 5 kolonies in 1/4 van de helling,
+:	groei op 2/4 van de helling,
++:	groei op 3/4 van de helling,
+++:	groei op de hele helling .

Cellen in een gramkleuring (polymorfonucleairen en mondepitheelcellen):

zeldzaam:	< 1 cel / low power field (LPF),
+:	1 à 9 cellen / LPF,
++:	10 à 25 cellen / LPF,
+++:	> 25 cellen/ LPF.

Bacteriën in een gramkleuring:

zeldzaam:	< 1 bacterie / oil immersion field (OIF),
-----------	---

+:	1 à 5 bacteriën / OIF,
++:	6 à 30 bacteriën / OIF,
+++:	> 30 bacteriën / OIF.

Resultaten

In totaal analyseerde ik 65 stalen. Het ging om 19 sputumstalen, 32 bronchusaspiraten, 6 stalen van mucoviscidosepatiënten en 8 BAL-vochten. Alle stalen werden na aankomst in het labo maximaal 10 uur bij koelkasttemperatuur bewaard vooraleer ze door mij geënt werden. De routine-enting ging altijd aan mijn experimentele enting vooraf.

De 7 stalen die aan het originele testprotocol werden onderworpen waren 5 bronchusaspiraten en 2 sputumstalen. Hiervan werden 3 stalen succesvol vervloeid met een verdunning met SLS van 1:1 (1 deel staal : 1 deel SLS). De 4 overige stalen waren onvoldoende vervloeid, maar werden niet verder verdund en toch geënt. Op 58 stalen werd het nieuwe protocol toegepast tot ze volledig waren vervloeid. Ze doorstonden met andere woorden na een of meer verdunningen met SLS de pipetteerproef. 22 stalen van deze 58 (38%) vervloeiden volledig na een verdunning van 1:1. Een verdunning van 1:2 was voldoende voor 17 stalen (29%). Verdunningen van 1:3 en 1:4 waren nodig om 3 (5%) en 16 (28%) van de stalen te vervloeien. Het staaltype dat het vaakst nood had aan de 1:4-verdunning was sputum, BAL het minst vaak. Drie van de acht BAL-vochten waren niet pipetteerbaar vóór de voorbehandeling.

Boelens beschrijft in een ECCMID-abstract dat 75% van 50 geteste sputa en bronchusaspiraten (muco-stalen en BAL-vochten werden uitgesloten) met SLS in een 1:1 verdunning volledig vervloeiden [Boelens et al. 2014]. In een andere studie, waarin 75 sputumstalen 1:1 verdund werden met Digest-EUR®, een ander DTT-bevattend mucolyticum, wordt 92% daarvan succesvol vervloeid [Nebbad-Lechani et al. 2013]. In mijn experiment vervloeide slechts 24% van de sputa met die verdunning.

Voor de vergelijking tussen de Gramkleuringen met en zonder voorbehandeling met SLS stelde ik draaitabellen op voor drie elementen: polymorfonucleairen (PN), mondepitheelcellen (ME) en mondflora (MF). De beoordeling (zeldzaam, +, ++ of +++) van de aanwezigheid van PN was dezelfde in beide testprotocols (concordant) voor 45 van 65 stalen (69%) (Tabel 1). Voor 8 stalen was er een verschil van 2 of 3 categorieën (discordant), waarbij telkens meer PN werden gezien in de niet-voorbehandelde stalen. De 12 overige stalen verschilden telkens met 1 categorie.

Tabel 1 Draaitabel polymorfonucleairen

PN	SLS				
Controle	zeldzaam	+	++	+++	Totaal
zeldzaam	10				10
+	2	6			8
++	1	5	8	1	15
+++	3	4	4	21	32
Totaal	16	15	12	22	65

45 Concordant
8 Discordant

Voor de ME observeerde ik hetzelfde fenomeen met 40 concordante (62%) en 7 discordante stalen (Tabel 2). Opnieuw werden daarbij meer ME gezien in de niet-behandelde stalen, behalve in 1 discordant staal. Bij nazicht hiervan was het uitstrijkje van het niet-behandelde staal zo dens, dat de vele ME niet van elkaar onderscheiden konden worden.

Tabel 2 Draaitabel mondepitheelcellen

ME	SLS				
Controle	zeldzaam	+	++	+++	Totaal
Zeldzaam	26	3		1	30
+	4	5			9
++	4	7	3	2	16
+++		2	2	6	10
Totaal	34	17	5	9	65

40 Concordant
7 Discordant

Ook MF was iets prominenter aanwezig in de niet-behandelde stalen met 5 discordante resultaten, waarbij elke keer minder MF werd gezien in het voorbehandelde staal (Tabel 3). Voor 46 stalen (71%) was de beoordeling van MF concordant.

Tabel 3 Draaitabel mondflora

MF	SLS				
Controle	zeldzaam	+	++	+++	Totaal
Zeldzaam	38	1			39
+	6	5	1		12
++	2	4	1		7
+++	2	1	2	2	7
Totaal	48	11	4	2	65

46 Concordant
5 Discordant

De vermelding van overheersende kiemen met een bepaalde morfologie in de Gramkleuring vergeleek ik staal per staal tussen de testprotocols. In 44 stalen van de 65 (68%) was de kwantificering identiek. Voor 19 stalen verschilden de beoordelingen met één categorie, waarbij – twee stalen uitgezonderd – telkens meer van die kiem werd gezien in het niet-behandelde staal. Het ging meestal om gramnegatieve diplokokken en gramnegatieve staven. Er waren 3 stalen waarvan de beoordelingen van de overheersende kiem twee categorieën van elkaar verschilden. Elke keer werden minder kiemen gezien in het uitstrijkje van het voorbehandelde staal. Hier ging het om gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven of gisten. Ik kon geen trend ontdekken in het voorkomen van de discrepanties onder de verschillende staaltypes.

Ondanks de overwegend concordante resultaten voor de Gramkleuring, zien we hier toch dat bij discordante resultaten de tellingen van de verschillende elementen meestal lager liggen in het SLS-protocol. Mogelijk speelt de verdunning hier een rol in. Boelens beschrijft in een abstract ook dat de Grampreparaten van 5 van 49 respiratoire stalen opvallend minder witte bloedcellen bevatten na SLS-behandeling. Het omgekeerde werd niet geobserveerd [Boelens et al. 2013]. Buchan vergeleek de Gramkleuringen van 53 sputumstalen voor en na behandeling met SLS en na behandeling met SLS én uitstrijking op de WASP, maar de resultaten van de drie protocols waren vergelijkbaar [Buchan et al. 2014]. Doyle rapporteert dat voor 86 luchtwegstalen de telling van PN in de Gramkleuring overeenkomt in 68% van de gevallen. Binnen de discrepante resultaten was het voorkomen van een hoger aantal PN vijf keer frequenter in de SLS-stalen dan in de niet-behandelde stalen. Hiertegenover, maar meer in de lijn van mijn resultaten, ligt de observatie dat de hoeveelheid gramnegatieve staven voor de discrepante tellingen meestal hoger was in de niet-behandelde stalen [Doyle et al. 2012]. Wat Doyle nog vermeldt en wat ik ook observeerde, is dat SLS in de Gramkleuring zorgt voor een debris dat

gramnegatief aankleurt. Mogelijk zijn de gramnegatieve staafjes hiertussen niet goed te herkennen. Cocquerelle ten slotte, besluit in haar abstract op basis van 10 stalen dat SLS-behandeling niet verenigbaar is met de gramkleuring [Cocquerelle et al. 2012]. Ik sluit me hierbij aan en verkies de kleuring uit te voeren op het verse staal.

Vervolgens vergeleek ik de cultuurresultaten van de 65 stalen zonder voorbehandeling (Controle) met die van hun tegenhangers mét voorbehandeling (SLS). Onder één resultaat moet hier de groei van een mogelijk pathogene bacterie of de groei van een schimmel of mondflora of gisten worden verstaan.

De Controlekweek en de SLS-kweek leverden ongeveer evenveel resultaten op, namelijk 111 (Controle) en 109 (SLS). Zeven controlestalen en acht SLS-stalen vertoonden geen groei. De kiemidentificaties waren voor 105 resultaten dezelfde in beide protocols. Tien resultaten werden enkel bij het ene of andere testprotocol teruggevonden (Tabel 4): de *Aspergillus fumigatus* (twee keer) en de *Rhizopus spp.* in de controlestalen werden niet teruggevonden in de resultaten van de routine. De *Rhizopus spp.* en één van de *A. fumigatus* werden uit hetzelfde staal gekweekt van een patiënt bij wie ook *Rhizopus spp.* uit verschillende biopsies werden geïsoleerd.

Tabel 4 Kiemen uitsluitend in Controle- of SLS-stalen teruggevonden

n	Wel aanwezig in Controle, niet in SLS	Significant?
1	<i>Acinetobacter spp.</i>	Mogelijk
1	<i>Enterobacter spp.</i>	Nee
1	<i>Rhizopus spp.</i>	Ja
2	<i>A. fumigatus</i>	Mogelijk
1	Mondflora	Nee
n	Niet aanwezig in Controle, wel in SLS	
1	<i>E. faecalis</i>	Mogelijk
1	<i>S. marcescens</i>	Mogelijk
2	<i>S. aureus</i>	Nee

De *Enterobacter spp.* (uit een controlestaal) en de *S. aureus* (twee keer uit een SLS-staal) waren slechts zeldzaam gegroeid in aanwezigheid van andere pathogenen en/of mondflora en daarom niet significant. De groei van mondflora was zeldzaam in het controlestaal. De *Acinetobacter spp.* in het controlestaal en de *S. marcescens* in het SLS-staal zijn uit hetzelfde bronchusaspiraatspoor gekweekt. In zowel controle- als SLS-staal kon ook *P. aeruginosa* worden geïsoleerd. De routinekweek van dit staal spoorde zowel *S. marcescens* als *Acinetobacter spp.* op, maar niet *P. aeruginosa*. Deze drie bacteriën groeiden altijd slechts zeldzaam. Wellicht was het niet mogelijk om de kolonies op één plaat van elkaar te onderscheiden. De *E. faecalis* ten slotte, werd in de SLS-kweek gevonden (++) en in de routine (+++), maar niet in de controlekweek.

De semikwantitatieve beoordeling van de groei, ten slotte, was dezelfde in beide testprotocols voor 70 van de 104 identieke kiemen (67%). Vijftien en vier kiemen waren respectievelijk één en twee à drie categorieën sterker gegroeid in de controlekweek dan in de SLS-kweek. Omgekeerd gold dat 12 kiemen in de SLS-kweek één categorie sterker en 3 kiemen twee à drie categorieën sterker waren gegroeid dan in de controlekweek (Tabel 5).

Tabel 5 Discrepanties in de hoeveelheid groei

n	Controle 1 categorie hoger dan SLS	n	Controle 1 categorie lager dan SLS
1	Omkapselde <i>P. aeruginosa</i>	1	<i>P. aeruginosa</i>
2	<i>S. maltophilia</i>	1	<i>A. xylosoxidans</i>
2	<i>E. coli</i>	1	<i>C. freundii</i>
2	<i>K. oxytoca</i>	1	<i>C. koseri</i>
1	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>E. coli</i>
2	Gisten	1	<i>Enterobacter spp.</i>
5	Mondflora	1	<i>M. catarrhalis</i>
		2	Gisten
		2	Mondflora
n	Controle 2 of 3 categorieën hoger dan SLS	n	Controle 2 of 3 categorieën lager dan SLS
1	Omkapselde <i>P. aeruginosa</i>	1	<i>E. coli</i>
1	<i>C. koseri</i>	2	Mondflora
2	Gisten		

De auteurs van de beschikbare abstracts en posters zijn het er unaniem over eens dat de staalbehandeling met SLS geen afname van de kwaliteit van de cultuur teweegbrengt. Sommige auteurs besluiten dat de overeenkomst tussen routine- en SLS-cultuur goed is [Bielli et al. 2011; Boelens et al. 2013; Doyle et al. 2012]. Anderen beoordelen de SLS-kweek als performanter dan de routinekweek wegens een hoger aantal isolaten en/of door een hogere kolonietelling [Buchan et al. 2014; Cocquerelle et al. 2012; Silbert et al. 2012; Young et al. 2010]. Het meest opvallende resultaat wordt beschreven door Young: 52 stalen van mucoviscidosepatiënten leverden 140 isolaten op met de routinekweek en 158 met de SLS-kweek. Onder de extra kiemen in de SLS-kweek zijn *P. aeruginosa* (15 maal), *B. cepacia*, *H. influenzae* (beide 1 maal) en twee schimmels [Young et al. 2010]. Mijn meer bescheiden besluit luidt dat er een goede overeenkomst is tussen de protocols.

Galactomannan

BAL-vochten zijn soms te viskeus om gepipetteerd te worden, wat hen ongeschikt maakt voor de bepaling van galactomannan. De eventuele mogelijkheid om deze stalen te vervloeien zou betekenen dat deze analyse alsnog uitgevoerd kan worden. Daarom heb ik uitgetest wat het effect is van de voorbehandeling van BAL-vochten met SLS op de bepaling van galactomannan. Hiertoe heb ik de BAL-vochten geanalyseerd van 7 patiënten, die volgens de herziene definities voor invasieve aspergillose (IA) van de EORTC/MSG Consensus Group “proven” of “probable invasive aspergillosis” hadden en van 26 patiënten zonder vermoeden van IA of met een klinisch vermoeden van IA, maar die in geen van de EORTC-categorieën kan worden ondergebracht [De Pauw et al. 2008]. De stalen werden een halve maand tot 16 maanden eerder ingevroren bij -20°C. Alle stalen waren oorspronkelijk positief getest voor galactomannan met een Optical Density Index (ODI) boven of gelijk aan de cut-off van 0,5. Een deel van elk staal heb ik na ontdooien verdund met SLS in een volumeverhouding van 1:1. Een ander deel van elk staal heb ik in dezelfde 1:1 volumeverhouding verdund met fysiologisch water. Na minstens 15 minuten incubatietijd bij kamertemperatuur werden de verdunningen getest op galactomannan met een commerciële sandwich-ELISA (Platelia, Bio-Rad). Het fysiologisch water en de SLS werden ook eenmalig zonder vermenging met patiëntenstaal getest en bleken negatief voor galactomannan.

De resultaten van de oorspronkelijke meting van galactomannan voor de 7 patiënten met een proven of probable IA varieerden tussen 1,7 en 6,6 met een gemiddelde 3,4. Na 1:1 verdunning met fysiologisch water

lagen de resultaten tussen 0,8 en 5,5 met een gemiddelde van 2,5. De nieuwe meetresultaten lagen met andere woorden tamelijk dicht bij de originele, ondanks het feit dat ze niet werden herrekend voor de verdunningsfactor. De resultaten van de verdunning met SLS tonen allen een complete negativering tot 0,0. Een vergelijkbaar fenomeen zien we voor de stalen van de 26 patiënten zonder vermoeden van of met een niet te classificeren vorm van vermoedelijke IA: de originele resultaten schommelen tussen 0,7 en 7,1 met een gemiddelde van 3,6. De nieuwe resultaten na verdunning met fysiologisch water liggen tussen 0,3 en 9,2 met een gemiddelde van 2,7. Op enkele uitschieters na zien we hier bij de verdunde stalen, zoals kan verwacht worden, wel een afname met ongeveer de helft van de oorspronkelijke indexwaarde. De 1:1 verdunning met SLS zorgt weer voor het kelderen van de indices. Deze liggen tussen 0,0 en 0,3 met een gemiddelde van 0,04.

Een gelijkaardige observatie werd eerder door Prattes gemaakt [Prattes et al. 2015]. Ook hij hertestte 15 eerder ingevroren BAL-vochten van patiënten zonder IA of met proven, probable of possible IA, in overeenstemming met de definities van de EORTC/MSG Consensus Group [De Pauw et al. 2008]. Hij analyseerde het ontdooide staal enerzijds rechtstreeks na vortexen, maar zonder verdunning met fysiologisch water en anderzijds na voorbehandeling in een 1:1-volumeverhouding met Sputasol® (Oxoid), eveneens een mucolyticum op basis van DTT. De mediaan en range van de onbehandelde stalen bleven nagenoeg ongewijzigd voor en na het invriezen. De mediaan bedroeg 0,73 vóór en 0,51 na invriezen en de range was [0,15 – 16,79] vóór versus [0,08 – 16,79] na invriezen. De ontdooide en met Sputasol® voorbehandelde stalen hadden een mediaan van 0,01 en een range van [0,00 – 0,01].

SLS in de praktijk

Tijdens mijn vergelijkende experimenten heb ik heel wat ervaring opgedaan met de SLS. Hieronder volgen enkele bedenkingen in verband met het gebruik ervan.

Voor het overbrengen van staal in het buisje SLS biedt Copan steriele bolpipetten aan bij de SLS. Zelf gebruikte ik een generieke steriele bolpipet, zoals die voor allerhande doeleinden in het labo beschikbaar is. Niet zelden waren de respiratoire stalen zo viskeus dat opzuigen ervan zeer moeilijk was. Voor een efficiënte staalbehandeling is een pipet met brede opening praktisch. Ik kan echter niet zeggen of de pipetten van Copan dat voordeel hebben. Om erg viskeuze stalen over te brengen in de SLS-tube bracht Copan wel de Sputum Dipper op de markt. Dit is een soort plastic Archimedeschroefje, dat door een draaibeweging doorheen taaie sputa snijdt er ongeveer 0,5 ml van opneemt. Het past net in de SLS-tube en de steel kan halverwege afgebroken worden en achtergelaten in de tube. Bij het sluiten van de tube zet de steel zich vanzelf vast in de dop, zoals bij de ESwab. Ik heb deze Sputum Dipper voor enkele viskeuze stalen uitgetest en ondervonden dat er vaak te veel staal op het schroefje terecht kwam en dat de aanwezigheid van de schroef in de tube de homogenisatie tijdens het vortexen stoort.

Onze routinekweek van respiratoire stalen behelst vaak het enten van een Sabouraud. Deze wordt tot drie weken na het enten afgelezen. Om uitdroging te voorkomen zit deze bodem niet in een petriplaat, maar in een buis. Ik heb tot nu toe geen weet van entautomaten die een vaste schuine bodem in een buis kunnen inoculeren. De enting van de Sabouraud blijft daarom vermoedelijk manueel. Eenzelfde obstakel vormt het leggen van de optochine- en chlooramfenicolschijfjes. Deze functie zou wel op de WASP (Copan) aanwezig zijn, maar niet op de InoqulA van (BD Kiestra) [Buchan et al 2014].

Het gebruik van SLS zorgt voor veel afval. Voor elke staal is ten eerste een tube SLS nodig (en voor 62% van de stalen meer dan één). Deze tubes zitten per vijf vacuüm verpakt in plastic. Er zitten zes dergelijke plastic

verpakkingen in één kartonnen doosje samen met een papieren bijsluiter van vier A4's dik. Tien doosjes passen dan weer in een kartonnen doos. Elke staalvoorbereiding verbruikt een bolpipet of een Sputum Dipper en bijhorende verpakking. Tenslotte doet de Inoqua er nog een pipettip bovenop. De huidige manuele kweek verbruikt enkel gas bij het uitvlammen van de öse.

Het gebruik van SLS heeft natuurlijk ook een prijs: één tube SLS van 1 ml kostte in deze studie €1,87, een Sputum Dipper €0,36.

Conclusie

Binnen afzienbare tijd zal een systeem voor totale automatisatie zijn intrede doen op onze dienst microbiologie. Bij de beslissing om de kweek van respiratoire stalen al dan niet te automatiseren kunnen volgende conclusies een rol spelen: SLS is een kant-en-klaar gealiquoteerd mucolyticum dat de vervloeiing van viskeuze stalen toelaat zonder de resultaten van de conventionele kweek aan te tasten. De resultaten van de Gramkleuringen daarentegen worden wel beïnvloed door de behandeling van het staal met SLS. Daarom raad ik aan de Grampreparaten te maken met het verse staal. Vaak zal meer dan één tube SLS nodig zijn om voldoende vervloeiing te bekomen. In deze studie kon echter geen nefast effect van een sterke verdunning worden vastgesteld op de kweek of Gramkleuring. Wel maakt het de staalvoorbereiding tamelijk arbeidsintensief. Tezamen met de mogelijke noodzaak om manueel de Sabouraudbuizen te blijven enten, de Grampreparaten te maken en de optochine- en chlooramfenicolschijfjes te leggen kan dit de vraag doen rijzen of de klassieke werkwijze niet efficiënter is. Om die te beantwoorden is werkervaring met de toestellen nodig en een bestudering van hun performantie. BAL-vochten vervloeid met SLS zijn niet geschikt voor de analyse van galactomannan.

To do/ACTIONS

- 1) Voorstelling van dit project aan de MLT's;
- 2) Vergelijking van de automatische enting met de huidige methode;
- 3) Het effect op mycobacteriële kweek van SLS bekijken.

ATTACHMENTS

Attachment 1: SOP-035 Tabel 2: Interpretatiecriteria Gramkleuring en cultuur

Attachment 2: SOP-031 Bijlage 2: Identificatieschema gisten

Attachment 3: Copan SLSolution bijsluiter

SPUTUM					
macroscopisch	gramkleuring	potentiële pathogenen	hoeveelheid	identificatie	AB
mucoïd mucopurulent purulent bloederig waterig	wat vermelden - speciale aandacht voor: cellen: plaveiselepitheelcellen polynucleairen <u>bacteriën:</u> - vermeld aanwezigheid van mondflora (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...) - vermeld op semi-kwantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken) gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis) gramnegatieve staven (enterobacteriën,, non-fermenters en H. influenzae) stafylokokken gisten	streptokokken -pneumokokken	elke	α-hemolytische kolonies, optochine S, kolonies met centrale afplatting en verheven rand, sommige kapseltypen vormen mucoïde kolonies (SOP-038 Tabel 1)	AB op MH+bloed, resultaat (oxa, erythro, tetra) invullen op werklijst "ABpneumokok" indien oxa niet S: MIC voor penicilline en cefotaxime uitvoeren en resultaat dan pas antwoorden (cave optochine gevoelige S. mitis, deze blijven korrelig indien in suspensie gebracht, S. pneumoniae geeft een homogene suspensie)
		-β-hemolytische streptokokken	duidelijke aanwezigheid	MaldiBiotyper of Strep Mondial groep A= SRPY, groep B=SRAG, andere worden geantwoord met groepsletter. Groep D te beschouwen als mondflora (uitzondering: indien reincultuur bij patiënten op intensieve diensten	in de regel gevoelig aan peni; AB op MH + bloed, resultaat voor erythro en clinda invullen op werklijst "Abstreptokokken"
		Moraxella catarrhalis	duidelijke aanwezigheid	witte(ecru), niet hemolytische kolonies, schuiven over bodem, MaldiBiotyper of hydrolyse van tributyrine positief (SOP-038 Tabel 8)	β-lactamase test, indien +: AB dispenser "Moraxella catarrhalis" en resultaten invullen op werklijst "Abmoraxella catarrhalis"
		Haemophilus influenzae	duidelijke aanwezigheid elke indien rein	gladde, niet-hemolytische kolonies (geur) op Haemophilusbodem; MaldiBiotyper of groei op TSA enkel rond schijfje met X + V; ONPG test negatief (SOP-038 Tabel 6)	enkel β-lactamase test uitvoeren en antwoorden als H.influenzae beta-lactamase positief of negatief
		gramnegatieven -enterobacteriën	indien rein of >; indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-non-fermenters	indien rein of >; indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-cave Pasteurella	indien rein of >+	!groeit NIET op MacConkey! Enkel groei op BA en Haemophilusbodem. Identificatie: MaldiBiotyper of Vitek.	Vitek
		stafylokokken -STAU	elke (bij duidelijke aanwezigheid van mondflora: vanaf ++)	MaldiBiotyper of coagulase tube test + DNase test	Vitek
		gisten	enkel groei vermelden indien aangevraagd; bij rijke groei +++ ook cultuur antwoorden als niet aangevraagd nooit antwoorden indien ook groei van andere mondflora (na uitsluiting van C. neoformans/gattii; zie SOP-031 Bijlage 2)		enkel op aanvraag, E-test op een RPMI-agar (SOP-034 Bijlage 2 'Manuele gevoeligheidsbepalingen'
		fungi	elke	Schimmels doorgeven aan de werkpost Identificaties.	nvt
		indien enkel commensale flora aanwezig (viridans streptokokken, cns, Neisseria, ...): mondflora			
		indien geen groei: geen groei			

BRONCHUSASPIRAAT					
macroscopisch	gramkleuring	potentiële pathogenen	hoeveelheid	identificatie	AB
mucoïd mucopurulent purulent bloederig waterig redon	wat vermelden - speciale aandacht voor: <u>cellen:</u> plaveiselepitheelcellen polynucleairen <u>bacteriën:</u> - vermeld aanwezigheid van mondflora (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...) - vermeld op semi-kwantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken) gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis) gramnegatieve staven (enterobacteriën,, non-fermenters en H. influenzae) stafylokokken gisten	streptokokken -pneumokokken	elke	α-hemolytische kolonies, optochine S, kolonies met centrale afplatting en verheven rand, sommige kapseltypen vormen mucoïde kolonies (SOP-038 Tabel 1)	AB op MH+bloed, resultaat (oxa, erythro, tetra) invullen op werklijst "ABpneumokok" indien oxa niet S: MIC voor penicilline en cefotaxime uitvoeren en resultaat dan pas antwoorden (cave optochine gevoelige S. mitis, deze blijven korrelig indien in suspensie gebracht, S. pneumoniae geeft een homogene suspensie)
		-β-hemolytische streptokokken	duidelijke aanwezigheid	MaldiBiotyper of Strep Mondial groep A= SRPY, groep B=SRAG, andere worden geantwoord met groepsletter. Groep D te beschouwen als mondflora (uitzondering: indien reïncultuur bij patiënten op intensieve diensten	in de regel gevoelig aan peni; AB op MH + bloed, resultaat voor erythro en clinda invullen op werklijst "Abstreptokokken"
		Moraxella catarrhalis	duidelijke aanwezigheid	witte(ecru), niet hemolytische kolonies, schuiven over bodem, MaldiBiotyper of hydrolyse van tributyrine positief (SOP-038 Tabel 8)	β-lactamase test, indien +: AB dispenser "Moraxella catarrhalis" en resultaten invullen op werklijst "Abmoraxella catarrhalis"
		Haemophilus influenzae	duidelijke aanwezigheid elke indien rein	gladde, niet-hemolytische kolonies (geur) op Haemophilusbodem; MaldiBiotyper of groei op TSA enkel rond schijfje met X + V; ONPG test negatief (SOP-038 Tabel 6)	enkel β-lactamase test uitvoeren en antwoorden als H.influenzae beta-lactamase positief of negatief
		gramnegatieven -enterobacteriën	indien rein of >+; indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-non-fermenters	indien rein of >+; indien gram geen PN en MFL +++ pas uitwerken bij groei vanaf ++	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-cave Pasteurella	indien rein of >+	!groeit NIET op MacConkey! Enkel groei op BA en Haemophilusbodem. Identificatie: MaldiBiotyper of Vitek.	Vitek
		stafylokokken -STAU	elke (bij duidelijke aanwezigheid van mondflora: vanaf ++)	MaldiBiotyper of coagulase tube test + DNase test	Vitek
		gisten	enkel groei vermelden indien aangevraagd; bij rijke groei +++ ook cultuur antwoorden als niet aangevraagd nooit antwoorden indien ook groei van andere mondflora (na uitsluiting van C. neoformans/gattii; zie SOP-031 Bijlage 2)	groei van gisten rapporteren indien gisten/schimmels aangevraagd; verdere identificatie volgens "Identificatieschema gisten" (SOP-031 Bijlage 2)	enkel op aanvraag, E-test op een RPMI-agar (SOP-034 Bijlage 2 'Manuele gevoeligheidsbepalingen'
		fungi	elke	Schimmels doorgeven aan de werkpost Identificaties.	nvt
		indien enkel commensale flora aanwezig (viridans streptokokken, cns, Neisseria, ...):			
		mondflora			
		indien geen groei:			
		geen groei			

BRONCHUSLAVAGE/BAL en PROTECTED SPECIMEN BRUSH (PSB)					
macroscopisch	gramkleuring	potentiële pathogenen	hoeveelheid	identificatie	AB
mucoïd mucopurulent purulent waterig bloederig	wat vermelden - speciale aandacht voor: <u>cellen:</u> plaveiselepitheelcellen polynucleairen <u>bacteriën:</u> - vermeld aanwezigheid van mondflora (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...) - vermeld op semi-kwantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken) gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis) gramnegatieve staven (enterobacteriën,, non-fermenters en H. influenzae) stafylokokken gisten	streptokokken -pneumokokken	elke	α-hemolytische kolonies, optochine S, kolonies met centrale afplatting en verheven rand, sommige kapseltypen vormen mucoïde kolonies (SOP-038 Tabel 1)	AB op MH+bloed, resultaat (oxa, erythro, tetra) invullen op werklijst "ABpneumokok" indien oxa niet S: MIC voor penicilline en cefotaxime uitvoeren en resultaat dan pas antwoorden (cave optochine gevoelige S. mitis, deze blijven korrelig indien in suspensie gebracht, S. pneumoniae geeft een homogene suspensie)
		-β-hemolytische streptokokken	elke	MaldiBiotyper of Strep Mondial groep A= SRPY, groep B=SRAG, andere worden geantwoord met groepsletter (voor groep D cfr.enterokokken)	in de regel gevoelig aan peni; AB op MH + bloed, resultaat voor erythro en clinda invullen op werklijst "Abstreptokokken"
		-enterokokken	indien reincultuur (voor stalen van intensieve eenheden)	MaldiBiotyper	AB op MH (ampi, vanco) belangrijk voor het opsporen van vancomycine resistente E.faecium kolonisatie bij patiënten op ICU (anders te beschouwen als mondflora)
		Moraxella catarrhalis	elke	witte ecru), niet hemolytische kolonies, schuiven over bodem, MaldiBiotyper of hydrolyse van tributyrine positief (SOP-038 Tabel 8)	β-lactamase test, indien +: AB dispenser "Moraxella catarrhalis" en resultaten invullen op werklijst "Abmoraxella catarrhalis"
		Haemophilus influenzae	elke	gladde, niet-hemolytische kolonies (geur) op Haemophilusbodem; MaldiBiotyper of groei op TSA enkel rond schijfje met X + V; ONPG test negatief (SOP-038 Tabel 6)	enkel β-lactamase test uitvoeren en antwoorden als H.influenzae beta-lactamase positief of negatief
		gramnegatieven			
		-enterobacteriën	elke	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-non-fermenters	elke	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-cave Pasteurella	elke	!groeit NIET op MacConkey! Enkel groei op BA en Haemophilusbodem. Identificatie: MaldiBiotyper of Vitek.	Vitek
		stafylokokken -STAU	elke	MaldiBiotyper of coagulase tube test + DNase test	Vitek
		Legionella	enkel op aanvraag	groei op BCYE-agar als convexe, glinsterende kolonies met roze schijn, "geslepen glas"-aspect bij 10x vergroting→agglutinatie (SOP-032 Tabel1) MaldiBiotyper	nvt
		gisten	zeldzaam, +, ++ of +++ (enkel indien aangevraagd, anders mondflora tenzij +++) (na uitsluiting van C. neoformans/gattii; zie SOP-031 Bijlage 2)	C-plaat: groen mag geantwoord worden als CDAL, voor andere zie "Identificatieschema gisten" (SOP-031 Bijlage 2).	enkel op aanvraag, E-test op een RPMI-agar (SOP-034 Bijlage 2 'Manuele gevoeligheidsbepalingen')
		fungi	elke	Schimmels doorgeven aan de werkpost Identificaties.	nvt
		indien enkel commensale flora aanwezig (viridans streptokokken, cns, Neisseria, ...):			
		mondflora			
		indien geen groei:			
		geen groei			

RESPIRATOIR SPECIMEN MUCOVISCIDOSE PATIENT					
macroscopisch	gramkleuring	potentiële pathogenen	hoeveelheid	identificatie	AB
mucoïd mucopurulent purulent waterig bloederig wisser in transportbodem(TB)	wat vermelden - speciale aandacht voor: <u>cellen:</u> plaveiselepitheelcellen polynucleairen <u>bacteriën:</u> - vermeld aanwezigheid van mondflora (gevarieerde flora met o.a. grampositieve kokken, gramnegatieve diplokokken, gramnegatieve staven,...) - vermeld op semi-kwantitatieve manier overwegende flora van: grampositieve diplokokken (pneumokokken) gramnegatieve diplokokken (M. catarrhalis) gramnegatieve staven (enterobacteriën, non-fermenters en H. influenzae) stafylokokken gisten	streptokokken -pneumokokken	elke	α-hemolytische kolonies, optochine S, kolonies met centrale afplatting en verheven rand, sommige kapseltypen vormen mucoïde kolonies (SOP-038 Tabel 1)	AB op MH+bloed, resultaat (oxa, erythro, tetra) invullen op werklijst "ABpneumokok" indien oxa niet S: MIC voor penicilline en cefotaxime uitvoeren en resultaat dan pas antwoorden (cave optochine gevoelige S. mitis, deze blijven korrelig indien in suspensie gebracht, S. pneumoniae geeft een homogene suspensie)
		-β-hemolytische streptokokken	indien rijke groei	MaldiBiotyper of Strep Mondial groep A= SRPY, groep B=SRAG, andere worden geantwoord met groepsletter; groep D te beschouwen als mondflora	in de regel gevoelig aan peni; AB op MH + bloed, resultaat voor erythro en clinda invullen op werklijst "Abstreptokokken"
		Moraxella catarrhalis	indien rijke groei	witte(ecru), niet hemolytische kolonies, schuiven over bodem, MaldiBiotyper of hydrolyse van tributyrine positief (SOP-038 Tabel 8)	β-lactamase test, indien +: AB dispenser "Moraxella catarrhalis" en resultaten invullen op werklijst "Abmoraxella catarrhalis"
		Haemophilus influenzae	elke	gladde, niet-hemolytische kolonies (geur) op Haemophilusbodem; MaldiBiotyper of groei op TSA enkel rond schijfje met X + V; ONPG test negatief (SOP-038 Tabel 6)	enkel β-lactamase test uitvoeren en antwoorden als H.influenzae beta-lactamase positief of negatief
		gramnegatieven			
		-coliformen	indien rein of >+	MaldiBiotyper of Vitek	Vitek
		-lactose negatieven*	indien rein of >+	MaldiBiotyper of Vitek	manueel AB op MH, voor omkapselde en slecht groeiende isolaten op MH+bloed
		-Burkholderia cepacia*	elke	roze tot paarse kolonies op BUCEplaat verder uitwerken (MaldiBiotyper of Vitek)	manueel
		-cave Pasteurella	indien rein of >+	!groeit NIET op MacConkey! Enkel groei op BA en Haemophilusbodem. Identificatie: MaldiBiotyper of Vitek.	Vitek
		stafylokokken -STAU	elke	MaldiBiotyper of coagulase tube test + DNase test	Vitek
		gisten	enkel groei vermelden indien aangevraagd; bij rijke groei +++ ook cultuur antwoorden als niet aangevraagd (na uitsluiting van C. neoformans/gattii; zie SOP-031 Bijlage 2)	groei van gisten rapporteren indien gisten/schimmels aangevraagd; eventueel verdere identificatie volgens identificatieschema gisten" (SOP-031 Bijlage 2)	enkel op aanvraag, E-test op een RPMI-agar (SOP-034 Bijlage 2 'Manuele gevoeligheidsbepalingen')
		fungi	elke	Schimmels doorgeven aan de werkpost Identificaties	nvt
		indien enkel commensale flora aanwezig (viridans streptokokken, cns, Neisseria, ...):	indien geen groei:	* non-fermenters gedurende 3 weken bijhouden. BUCE bij een eerste isolaat doorsturen naar Prof. Van Damme (Gent); PSSP doorsturen naar Prof. Van Damme.	
		mondflora	geen groei		

IDENTIFICATIESCHEMA GISTEN

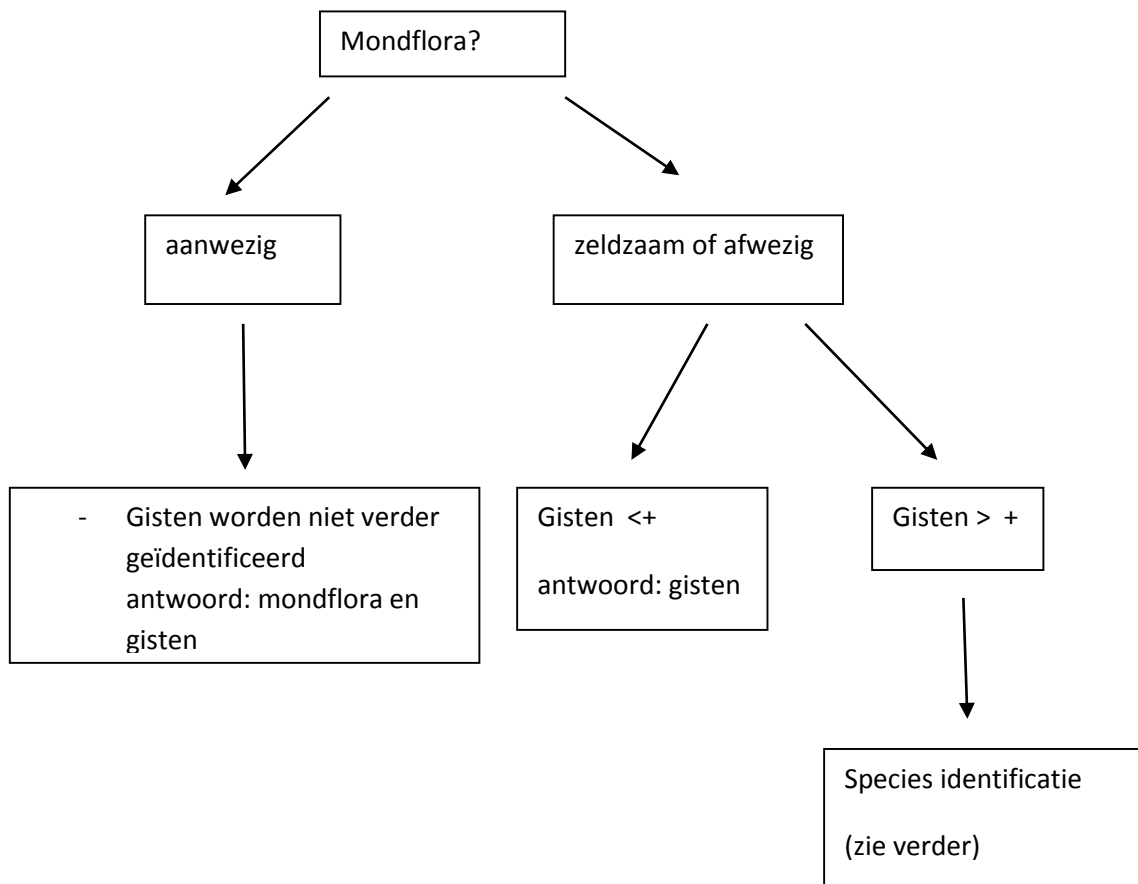
Respiratoire specimens

Voor **niet-BAL-vochten**:

gewoon gisten rapporteren zonder verdere identificatie vanaf +

Uitzondering: donkergekleurde gisten ("black yeasts") uit respiratoire stalen van mucopatiënten dienen altijd geïdentificeerd te worden.

Voor **BAL-vochten**: volgens onderstaand schema:



Cave! : in geval van "mucoïde" gisten denk steeds aan *Cryptococcus neoformans*

zet een "snelle urease"-test in:

-indien urease positief: identificatie bevestigen met Maldi-tof analyse of Vitek of ID32C (zie verder); bij bevestiging van aanwezigheid van *C. neoformans/gattii* deze als dusdanig antwoorden

-indien urease negatief: volg bovenstaand schema

Stalen andere dan respiratoire stalen

Identificatie tot op species niveau dient uitgevoerd te worden volgens onderstaande regels:

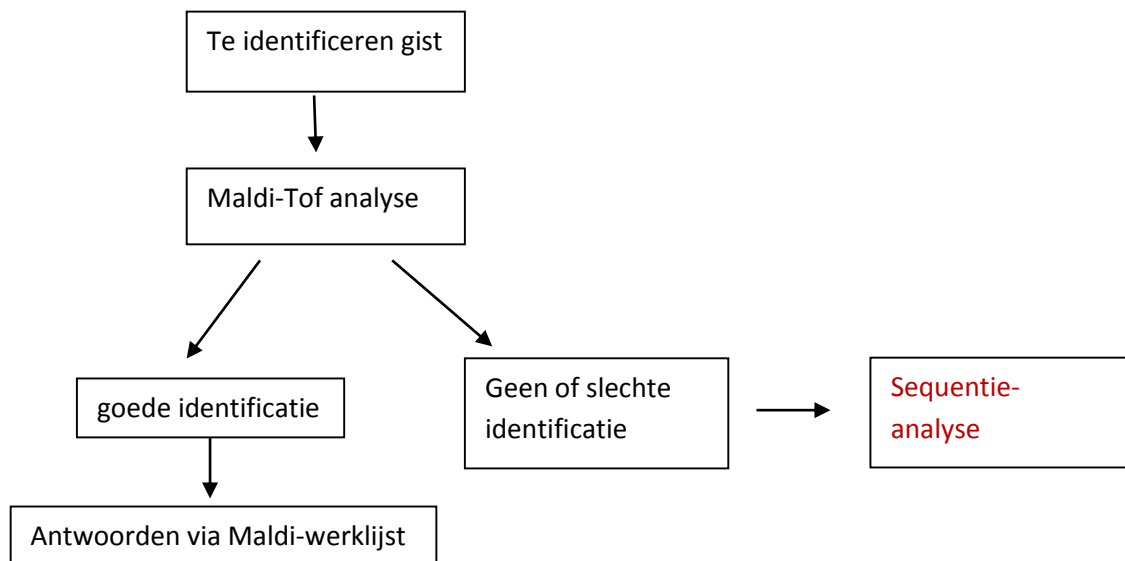
1. Normaal steriel lichaamsvochten (uitz. urine) en biopten: steeds
2. URINE: volgens onderstaand schema

Aantal kiemen/ml	Suprapubische punctie	Midstream	Uit verbijfsonde
$< 10^4$	species id	species ID	gisten
$10^4 - 10^5$	species id	species ID	species ID
$>10^5$	species id	species id	species id

Bij immunocompromiteerde patiënten kan altijd een identificatie tot op speciesniveau gevraagd worden

3. Genitale monsters: indien fungale kweek is aangevraagd
4. Wondvocht:
 - Steeds indien +++ (behalve indien wondvocht in contact met slijmvlies waarop kolonisatie frequent plaats vindt (vb. colon, rectum...))
 - Indien + of ++: afhankelijk van:
 - o - type patiënt (immunocompromiteerd, diabetes, behandeling met steroiden)
 - o - lokalisatie staalname
 - o - herhaaldelijke isolatie
5. SAM: indien +++
6. Intravasculaire katheters: steeds
7. Huid en nagels: enkel bij massieve groei van gisten

Species identificatie: gebruikte technieken:



Copan SL solution - Product Insert & How to Use Guide

ENGLISH

INTENDED USE

Copan SLsolution (Sputum Liquefying solution) is a ready-to-use mucolytic agent for liquefying sputum specimens prior to planting and streaking for the isolation of bacteria and fungi that cause respiratory tract infections..

SUMMARY

Copan SLsolution consists of phosphate buffered solution of dithiothreitol (DTT). The DTT solution is provided in a ready-to-use liquid format and the intended use is for digesting sputum samples prior to culturing. Copan SLsolution has been validated for use with Copan Walk-Away Specimen Processor (WASP) an automated system for planting and streaking of specimens onto culture media plates..

Copan SLsolution is available in different configurations: in bulk packs comprising multiple screw cap tubes filled with 1 ml of DTT solution or as kits comprising of one screw cap tube containing 1 ml of DTT solution plus a sterile disposable Pasteur pipet or Sputum Dipper transfer device. All SLsolution configurations are packaged within barrier plastic film pouches that have a modified atmosphere to maintain the stability and activity of the DTT reagent during the products shelf life.

REAGENTS

SLsolution components:

DTT (dithiothreitol) 1mg
PBS (phosphate buffer solution) 1ml

PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use.
- Observe approved biohazard precautions and aseptic techniques. To be used only by adequately trained and qualified personnel.
- All specimens and materials used to process them should be considered potentially infectious and handled in a manner which prevents infection of laboratory personnel. Sterilize all biohazard waste including specimen, containers and media after their use.
- Directions should be read and followed carefully.

STORAGE

This product is ready to use and no further preparation is necessary. The unopened bulk pack or individual kit pack can be stored at 5 - 25°C until used or until the expiration date. Do not overheat. Do not incubate or freeze prior to use. Improper storage will result in loss of efficacy. Do not use after expiration date, which is clearly printed on the outer box. The packaging for SLsolution comprises of barrier plastic film together with a modified atmosphere inside package maintains the stability of the product. After opening the package the tube(s) of SLsolution should be used immediately or must be stored at 2-8°C and used within 24 hours. Slight yellow coloration of the DTT reagent does not indicate any product deterioration.

PRODUCT DETERIORATION

Do not use **Copan SLsolution** if: (1) the product shows visible marks of damage or contamination; (2) there is evidence of leakage; (3) the expiration date has passed; (4) the package is open or more than 24hr and has not been stored in a refrigerator (5) there are other signs of deterioration.

MATERIALS SUPPLIED

Catalog No.	Product Descriptions	Pack Size	Suitable for Automation
097CE 097CE.A	Copan SLsolution in bulk: - 12X80 mm polypropylene screw-cap tubes with internal conical shape filled with 1ml of DTT solution in liquid phase	30 units per shelf pack 10x30 units per box	YES
095CE 095CE.A	Copan SLsolution Kit: - One 12X80 mm polypropylene screw-cap tube with internal conical shape filled with 1ml of DTT solution in liquid phase - One sterile pasteur pipet for sputum sample transfer	20 units per shelf pack 10x20 units per box	YES
099CE.A	Copan SLsolution in bulk: - 12X80 mm polypropylene screw-cap tubes with internal conical shape filled with 0.5 ml of DTT solution in liquid phase	30 units per shelf pack 10x30 units per box	YES

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Appropriate materials for the cultivation and isolation of bacteria and fungi. Refer to laboratory reference manuals for recommended protocols for culture and identification techniques

INSTRUCTIONS FOR USE

SLsolution in bulk:

- Open the plastic pack containing the tubes of SLsolution remove one tube and unscrew the cap
- Transfer sputum sample into the opened tube. NOTE: best results can be achieved transferring the sample into the SL solution respecting volumetric ratio about 1:1.
- Re-cap the tube of SLsolution
- Leave the test tube at room temperature for at least 15 minutes. A prolonged contact time, up to 6 hours does not impair the survival of bacteria or fungi contained in the sample. Vortex the test tube for 30 seconds at 2000/2500 rpm or until the mixture has liquefied.
- NOTE: for especially viscous samples, a minimum contact time above 15 minutes may be necessary. The operator is to ensure that the sample has actually liquefied
- Aseptically remove aliquots of the liquefied sputum and inoculate onto appropriate bacteriology culture medium.

SLsolution Kit with sterile Pasteur pipet:

- Peel open one sterile graduated pipet
- Suck up about 1ml of sputum specimen into the pipet. Open the plastic pack containing the tube of SLsolution remove one tube and unscrew the cap
- Transfer sputum sample into the opened tube.
- Re-cap the tube of SLsolution
- Leave the test tube at room temperature for at least 15 minutes. A prolonged contact time, up to 6 hours does not impair the survival of bacteria or fungi contained in the sample. Vortex the test tube for 30 seconds at 2000/2500 rpm or until the mixture has liquefied.
- NOTE: for especially viscous samples, a minimum contact time above 15 minutes may be necessary. The operator is to ensure that the sample has actually liquefied..
- Aseptically remove aliquots of the liquefied sputum and inoculate onto appropriate bacteriology culture medium.

LIMITATIONS

- In the laboratory, wear latex gloves and other protection commensurate with universal precautions when handling clinical specimens.
- Condition, timing, and volume of specimen collected for culture are significant variables in obtaining reliable culture results. Follow recommended guidelines for specimen collection.
- Copan SLsolution is not tested for acid resistant bacilli culture.
- Performance testing with Copan SL solution was conducted using laboratory strains spiked into the SL Solution tube and not using human specimens.
- Proper specimen collection from the patient is extremely critical for successful isolation and identification of infectious organisms. For specific guidance regarding specimen collection procedures, consult published reference manuals. Specimens should be collected as soon as possible after the clinical onset of disease. Highest bacterial titers are present during the acute illness.

WARNINGS

- Do not re-pack.
- Not suitable for any other application than intended use.
- The use of this product in association with any diagnostic assay or with any diagnostic instrumentation should be validated by the user before using.
- Do not use if the product is visibly damaged
- Do not ingest the medium.
- Directions for use must be followed carefully. The manufacturer cannot be held responsible for any unauthorized or unqualified use of the product.
- Product to be handled by trained personnel only.
- It must be assumed that all specimens contain infectious micro-organisms; therefore all specimens must be handled with appropriate precautions. After use, tubes must be disposed of according to laboratory regulations for infectious waste.
-  Copan SL solution is for single use only; reuse may cause a risk of infection and/or inaccurate results.
- Copan SL solution is for in-vitro diagnostics use only and is in no way intended for a curative or prophylactic purposes.

WASTE DISPOSAL

Unused reagents may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.

Dispose of used reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products. It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their nature and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

An investigation into the survival of respiratory pathogens listed below in contrived specimens that have been stored for 6 hours at room temperature following homogenisation with SL solution showed that organism remained viable and reculturable:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Haemophilus influenzae ATCC 10211
Stafilococcus aureus ATCC 6538



Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Moraxella catarrhalis ATCC 25238
Candida albicans ATCC 10231

PERFORMANCE TEST RESULTS

STRAIN	CFU ZERO TIME COUNT	CFU COUNT AFTER 6 HOURS AT ROOM TEMPERATURE
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	396	167
Haemophilus influenzae ATCC 10211	320	88
Staphylococcus aureus ATCC 6538	285	270
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	350	184
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	466	178
Moraxella catarrhalis ATCC 25238	501	37
Candida albicans ATCC 10231	275	260

Procedure for testing SL solution:

- Starting from a fresh culture plate of tester organism prepare 0.5 Mc Farland inoculum of the tester organism in PBS
- prepare appropriate dilutions in PBS of original 0.5 McF inoculum in order to obtain a diluted inoculum containing from 2000 to 20000 CFU/100 ul
- with a micropipette spike 100 ul of chosen dilution into SLsolution tube
- vortex inoculated tube for 30 seconds
- spread 100 ul of inoculated SL solution onto appropriate culture plate
- incubate the plate at 35°C for 48 hours in order to obtain zero time count plate
- hold the inoculated SL tubes for 6 hours at room temperature
- vortex inoculated tube for 30 seconds
- spread 100 ul of inoculated SL solution onto appropriate culture plate
- incubate the plate at 35°C for 48 hours in order to obtain six hours time count plate
- vortex for 30 seconds and spread 100 ul to obtain six hours plate and incubate it at 35°C for 48 hours

ACCEPTABILITY LIMITS : >10 CFU/plate after six hours at room temperature.

Copan SL solution – Presentazione e Uso del Prodotto

ITALIANO

USO PREVISTO

Copan SL solution (soluzione per la liquefazione dell'espettorato) è un prodotto pronto all'uso. La soluzione è costituita da un agente mucolitico per la liquefazione dei campioni di espettorato e viene utilizzato ancor prima della semina per l'isolamento di batteri e funghi che causano infezioni nel tratto respiratorio.

SOMMARIO

Copan SL solution consiste in una soluzione di fosfato tamponata di ditiotreitolo (DTT). La soluzione DTT in formato liquido pronto all'uso, è utilizzato per la digestione enzimatica dei campioni di espettorato prima della coltura. La soluzione SL Copan è stata omologata per l'utilizzo in concomitanza con Copan Walk-Away Specimen Processor (WASP) un sistema automatizzato per la semina e lo striscio di campioni su piastre di terreno di coltura. La soluzione SL Copan è disponibile in diverse configurazioni: in pacco intero comprendente più provette con tappo a vite contenenti 1 ml di soluzione DTT o come un kit composto da una provetta con tappo a vite contenente 1 ml di soluzione DTT sterile più una pipetta Pasteur monouso o uno Sputum Dipper (Mestolino per Espettorato) dispositivo per il trasferimento dell'espettorato. Tutte le soluzioni SL sono imballate all'interno di un pouch di plastica usato come barriera di protezione, i pouch mantengono un'atmosfera modificata per la stabilità e l'attività del reagente DTT per la durata del prodotto fino alla data di scadenza o al momento dell'utilizzo.

REAGENTI

Componenti soluzione SL:

DTT (ditiotreitolo) 1mg
PBS (soluzione di fosfato tamponata) 1ml

PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico in vitro.
- Osservare le precauzioni approvate relative a materiali biologici potenzialmente pericolosi e alle tecniche di asepsi. L'uso deve essere limitato al personale adeguatamente addestrato e qualificato.
- Tutti i campioni e materiali impiegati per l'analisi del prodotto sono da considerarsi potenzialmente infetti e devono essere quindi mantenuti in modo tale da evitare il rischio di infezione al personale di laboratorio. Dopo l'uso sterilizzare tutti i rifiuti potenzialmente pericolosi compresi campioni, contenitori e terreni di trasporto.
- Seguire rigorosamente le istruzioni.

CONSERVAZIONE

Questo prodotto è pronto all'uso e non necessita di ulteriori preparazioni. Il pacco intero non aperto o il pacco individuale del kit può essere conservato ad una temperatura di 5 - 25°C fino al momento dell'utilizzo o fino alla data di scadenza. Non surriscaldare. Non incubare o congelare prima dell'uso. Una conservazione inappropriata determina una perdita di efficacia. Non usare dopo la data di scadenza indicata sulla confezione sia esterna che interna. L'imballaggio della soluzione SL comprende è una pellicola di plastica usata come barriera di protezione. L'interno dell'involucro contiene un'atmosfera modificata per mantenere la stabilità del prodotto. Subito dopo l'apertura dell'involucro la soluzione SL dovrebbe essere usata immediatamente o dovrebbe essere conservata a 2-8°C e usata entro le 24 ore. Una colorazione del reagente DTT leggermente giallastro non indica un deterioramento del prodotto.

DETERIORAMENTO DEL PRODOTTO

Non usare **Copan SL SOLUTION** se: (1) il prodotto presenta segni visibili di danneggiamento o contaminazione; (2) evidenza di perdite; (3) oltrepassa la data di scadenza (4) l'involucro aperto più delle 24 ore e non conservato in frigorifero (5) presenza di altri segni di deterioramento.

MATERIALI FORNITI

Catalogo N.	Descrizione prodotto	Confezione	Adatto per l'automazione
097CE 097CE.A	Copan SLsolution in bulk: - 12X80 mm provette in polipropilene con tappo a vite forma conica interna contenente 1 ml di soluzione DTT in fase liquida	30 unità per confezione 10x30 unità per scatola	Sì
095CE 095CE.A	Copan SLsolution Kit: - Un 12X80 mm provette in polipropilene con tappo a vite forma conica interna contenente 1 ml di soluzione DTT in fase liquida - Una pipetta sterile Pasteur per il trasferimento del campione di espettorato	20 unità per confezione 10x20 unità per scatola	Sì
099CE.A	Copan SLsolution in bulk: - 12X80 mm provette in polipropilene con tappo a vite forma conica interna contenente 0.5 ml di soluzione DTT in fase liquida	30 unità per confezione 10x30 unità per scatola	Sì

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI:

Materiali adatti per la coltura e isolamento di batteri e funghi. Fare riferimento a manuali di laboratorio per il protocollo raccomandato sia per la coltura che per le tecniche d'identificazione.

ISTRUZIONI D'USO

Soluzione SL in bulk:

- Aprire il pacchetto di plastica contenente le provette con la soluzione SL, rimuovere una provetta e svitare il tappo.
- Trasferire il campione di espettorato nella provetta aperta. NOTA: i migliori risultati si ottengono trasferendo il campione nel terreno SL in rapporto volumetrico di circa 1:1.
- Riavvitare il tappo sulla provetta della soluzione SL.
- Lasciare la provetta a temperatura ambiente per almeno 15 minuti. Un tempo di contatto prolungato fino a 6 ore non determina un'azione inibitoria per la sopravvivenza di batteri e funghi nel prelievo. Vortexare la provetta per 30 secondi a 2000/2500 rpm o fin quando la miscela si sia liquefatta.
- NOTA: per campioni particolarmente viscosi potrebbe essere necessario un tempo di contatto minimo superiore ai 15 minuti. L'operatore è tenuto a verificare l'avvenuta liquefazione del campione.
- Rimuovere asetticamente aliquote di espettorato liquefatto e inoculare su un terreno adatto per la coltura batteriologica.

Kit della soluzione SL con pipetta sterile Pasteur:

- Strappare per aprire l'involucro di una pipetta sterile graduata.
- Prelevare circa 1ml di campione dell'espettorato con la pipetta sterile. Aprire il pacco di plastica contenente la provetta con la soluzione SL, rimuovere una provetta e svitare il tappo
- Trasferire il prelievo di espettorato nella provetta aperta
- Avvitare il tappo sulla provetta della soluzione SL
- Lasciare la provetta a temperatura ambiente per almeno 15 minuti. Un tempo di contatto prolungato fino a 6 ore non determina un'azione inibitoria per la sopravvivenza di batteri e funghi nel prelievo. Vortexare la provetta per 30 secondi a 2000/2500 rpm o fin quando la miscela si sia liquefatta.
- NOTA: per campioni particolarmente viscosi potrebbe essere necessario un tempo di contatto minimo superiore ai 15 minuti. L'operatore è tenuto a verificare l'avvenuta liquefazione del campione.
- Rimuovere asetticamente aliquote di espettorato liquefatto e inoculare su un terreno adatto per la coltura batteriologica.

RESTRIZIONI

- Durante il trattamento, in laboratorio, dei campioni clinici indossare guanti in lattice e indumenti di protezioni secondo le norme universali
- Condizioni, tempismo e quantità dei campioni prelevati per la coltura sono di estrema importanza per ottenere risultati affidabili. Seguire le linee guida raccomandate per la raccolta dei campioni.
- Copan SL solution non è testato per la coltura di bacilli acido resistenti.



- La verifica della performance con la soluzione SL Copan è stata condotta utilizzando ceppi di laboratorio in provetta e non su campioni umani.
- Per l'isolamento e identificazione di successo degli organismi infettivi, il corretto prelievo del campione, dal paziente, è di estrema importanza. Per specifiche indicazioni riguardanti le procedure di raccolta dei campioni, consultare i manuali di riferimento pubblicati. I campioni devono essere raccolti al più presto possibile dopo l'esordio clinico della malattia. I titoli batterici più alti sono presenti durante la malattia acuta.

AVVERTENZE

- Non riconfezionare
- Non utilizzare per applicazioni diverse dall'utilizzo stabilito.
- L'utilizzo di questo prodotto in associazione con test diagnostici o con qualsiasi altra strumentazione diagnostica dovrebbe essere convalidato da parte dell'utente prima dell'uso.
- Non usare se visibilmente danneggiato.
- Non ingerire il terreno.
- Attenersi rigorosamente alle istruzioni. Il produttore declina ogni responsabilità derivante dall'utilizzo del prodotto da parte di persone non autorizzate e non qualificate.
- L'uso del prodotto deve essere limitato solo al personale adeguatamente addestrato.
- Si deve presumere che tutti i campioni contengono microrganismi infettivi, quindi devono essere maneggiati con le opportune precauzioni. Dopo l'utilizzo, le provette devono essere smaltite secondo i regolamenti di laboratorio come per rifiuti infetti.
-  Copan SL solution è un prodotto monouso; il riutilizzo potrebbe causare un rischio di infezione e/o diagnosi non corretta.
- La soluzione SL Copan è solo per uso diagnostico in vitro e non è in alcun modo destinato a scopo curativo o medicamentoso profilattico.

SMALTIMENTO RIFIUTI

I reagenti non utilizzati possono essere considerati come rifiuti non pericolosi e smaltiti conformemente. Disporre di reagenti utilizzati, nonché qualsiasi altro materiale monouso contaminato seguendo le procedure relative a prodotti infetti o potenzialmente infetti. E' responsabilità di ogni laboratorio di trattare i rifiuti e gli effluenti prodotti a seconda della loro natura e grado di pericolosità, e in ogni caso devono essere trattati e smaltiti (o farli trattare e smaltire da terzi) in base alle normative vigenti.

CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE

Un'indagine sulla sopravvivenza dei patogeni respiratori in campioni artificiali, elencati qui di seguito, conservati a temperatura ambiente per 6 ore dopo l'omogeneizzazione con la soluzione SL, ha dimostrato che l'organismo è rimasto vitale e ricolture;

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Haemophilus influenzae ATCC 10211
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Moraxella catarrhalis ATCC 25238
Candida albicans ATCC 10231

CEPPI	CONTEGGIO TEMPO ZERO CFU	CFU CONTO DOPO 6 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	396	167
Haemophilus influenzae ATCC 10211	320	88
Staphylococcus aureus ATCC 6538	285	270
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	350	184
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	466	178
Moraxella catarrhalis ATCC 25238	501	37
Candida albicans ATCC 10231	275	260

Procedura per il test soluzione SL:

- Partendo da una coltura fresca in piastra, si procede alla preparazione di una sospensione 0.5 Mc Farland inoculo dell'organismo da analizzare in PBS.
- Preparare diluizioni appropriate in PBS dell'inoculo originale di 0,5 McF per poterne ottenere uno diluito, contenente da 2000 a 20000 CFU/100 ul.
- Con una micropipette prelevare 100 ul della diluizione scelta e inoculare nella provetta con la soluzione SL.
- Vortexare per 30 secondi.
- Dispensare 100 ul di soluzione SL inoculata su una piastra appropriata.
- Incubare la piastra a 35°C per 48 ore in modo da poter ottenere una piastra a conteggio tempo zero.
- Tenere la provetta SL inoculata a temperature ambiente per 6 ore.
- Agitare la provetta inoculata per 30 secondi.
- Dispensare 100 ul di soluzione SL inoculata su una piastra adatta.
- Incubare la piastra a 35°C per 48 ore in modo da poter ottenere una piastra per la conta al tempo zero.
- Agitare la provetta inoculata per 30 secondi ed espandere 100 ul da ottenere sei ore in piastra e incubare a 35°C per 48 ore.

LIMITI DI ACCETTABILITA' : >10 CFU/ piastra dopo sei ore a temperature ambiente.

Copan SL solution – Präsentation und Anwendung des Produkts

DEUTSCH

ANWENDUNG

Copan SLsolution (Lösung zur Verflüssigung des Auswurfs) ist ein gebrauchsfertiges Produkt. Die Lösung besteht aus einem mukolytischen Wirkstoff zur Verflüssigung von Auswurfproben. Zuvor wird sie zur Aussaat und zum Abstreifen für die Isolierung von Bakterien und Pilzen verwendet, die Atemwegsinfektionen hervorrufen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die SLsolution Copan besteht aus einer Dithiothreitol-tamponierten Phosphatlösung (DTT). Die DTT-Lösung ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit, die zur enzymatischen Verdünnung von Auswurf-Proben vor der Kultivierung verwendet wird. Die SLsolution Copan wurde für die Anwendung mit Copan Walk-Away Specimen Processor (WASP), einem automatisiertem Aussaat- und Abstreichsystem von Probeentnahmen auf Kulturschalen zugelassen. Copan ist in verschiedenen Formen erhältlich: Als Verpackung mit mehreren Reagenzgläsern mit Schraubverschluss und 1 ml DTT-Lösung oder als Set, bestehend aus einem Reagenzglas mit Schraubverschluss und 1 ml sterile DTT-Lösung, Einweg-Pasteur-Pipette oder einem Sputum Dipper (Löffel für Auswurf) zur Übertragung der Auswurfprobe. Alle SLsolution-Lösungen sind in einer Schutzplastikhülle verpackt. Diese Schutzhüllen enthalten eine modifizierte Atmosphäre, um die DTT-Reagenz während der Lebensdauer des Produkts bis zu seinem Verfallsdatum stabil und aktiv zu erhalten.

REAGENZIEN

Komponenten:
DTT (Dithiothreitol) 1mg
PBS (tamponierte Phosphatlösung) 1ml

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Für die In-vitro-Diagnose.
- Beachten Sie sämtliche Vorsichtsmaßnahmen für sehr gefährliches biologisches Material und wenden Sie die entsprechenden aseptischen Techniken an. Das Produkt sollte nur von entsprechend geschultem und qualifiziertem Personal angewendet werden.
- Alle Proben und alles verwendete Material sind als potentiell infektiös zu behandeln und müssen so aufbewahrt werden, dass eine Ansteckung des Laborpersonals ausgeschlossen ist. Sterilisieren Sie nach dem Gebrauch alle Abfälle, die eine große biologische Gefährdung darstellen könnten, wie z.B. Proben, Behälter und Transportmedien.
- Befolgen Sie strengstens die Anweisungen.

AUFBEWAHRUNG

Dieses Produkt ist gebrauchsfertig und bedarf keiner weiteren Vorbereitung. Die ganze Packung bzw. Einzelpackung des Sets kann bei einer Temperatur von 5 - 25°C bis zur Anwendung bzw. bis zum Verfallsdatum aufbewahrt werden. Nicht überhitzen! Nicht vor dem Gebrauch inkubieren oder einfrieren! Bei falscher Lagerung vermindert sich die Wirksamkeit des Produkts. Nicht nach dem Ablauf des Verfallsdatums auf der externen und internen Verpackung verwenden. Die Verpackung der SLsolution besteht aus einer Plastikfolie, die als Schutzschicht dient. In der Hülle befindet sich eine modifizierte Atmosphäre, die das Produkt stabil erhält. Nach der Öffnung der Hülle sollte die SLsolution sofort angewendet oder kann bei 2-8°C höchstens 24 Stunden aufbewahrt werden. Eine leichte Gelbfärbung des Reagens weist auf keinen Verschleiß des Produkts hin.

VERFALL DES PRODUKTS

Verwenden Sie **Copan SLsolution** nicht, wenn: (1) das Produkt sichtbar beschädigt oder verschmutzt ist, (2) das Produkt sichtbar undicht ist, (3) das Verfallsdatum abgelaufen ist, (4) die Verpackung seit über 24 Stunden offen und nicht im Kühlschrank aufbewahrt wurde oder (5) andere Anzeichen von Verschleiß sichtbar sind.

BENÖTIGTES MATERIAL, DASS ENTHALTEN IST:

Katalog-Nr.	Produktbeschreibung	Verpackung	Geeignet für automatische Systeme
097CE 097CE.A	SLsolution Copan in ganzer Packung: - 12X80 mm Reagenzglas aus Polypropylen mit Schraubverschluss mit konischem Boden, gefüllt mit 1 ml flüssiger DTT-Lösung	30 Einheiten pro Packung 10x30 Einheiten pro Schachtel	Ja
095CE 095CE.A	Copan SLsolution Set: - 12X80 mm Reagenzglas aus Polypropylen mit Schraubverschluss mit konischem Boden, gefüllt mit 1 ml flüssiger DTT-Lösung - Eine sterile Pasteur-Pipette zur Übertragung der Auswurfprobe	20 Einheiten pro Packung 10x20 Einheiten pro Schachtel	Ja
099CE.A	SLsolution Copan in ganzer Packung: - 12X80 mm Reagenzglas aus Polypropylen mit Schraubverschluss mit konischem Boden, gefüllt mit 0.5 ml flüssiger DTT-Lösung	30 Einheiten pro Packung 10x30 Einheiten pro Schachtel	Ja

BENÖTIGTES MATERIAL, DAS NICHT ENTHALTEN IST:

Material für die Kultivierung und Isolierung von Bakterien und Pilzen. Für das empfohlene Protokoll über Kultivierung und Identifizierungstechniken lesen Sie bitte die Laborhandbücher.



Copan Italia S.p.A. Via Perotti, 10 – 25125 BRESCIA – Italy Tel.: ++39 030 2687211–Fax: ++39 030 2687206 E-mail: info@copanitalia.com – Web site: www.copanitalia.com

GEBRAUCHSANWEISUNG

SLsolution in geschlossener Verpackung:

- Öffnen Sie die Plastikpackung mit den SLsolution-Reagenzgläsern, entnehmen Sie ein Reagenzglas und schrauben Sie den Deckel auf.
- Übertragen Sie die Probeentnahme des Auswurfs in das offene Reagenzglas. HINWEIS: Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Probe mit einem Volumenverhältnis von zirka 1:1 auf den SL Boden übertragen wird
- Schrauben Sie den Deckel wieder auf das SLsolution-Reagenzglas.
- Lassen Sie das Reagenzglas für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Eine längere Kontaktzeit bis zu 6 Stunden führt zu keiner Hemmwirkung für das Überleben von Bakterien und Pilzen in der Entnahmeprobe. Vortexten Sie das Reagenzglas für 30 Sekunden bei 2.000/2.500 U/min oder bis sich die Mischung verflüssigt hat. HINWEIS: Für besonders viskose Probeentnahmen könnte eine Mindestkontaktzeit über 15 Minuten erforderlich sein. Der Anwender muss die erfolgte Verflüssigung der Probeentnahme überprüfen
- Entnehmen Sie aseptisch eine flüssige Auswurfmenge und inokulieren Sie diese in einen geeigneten Nährboden für bakteriologische Kulturen.

SLsolution Set mit steriler Pasteur-Pipette:

- Reißen Sie die Hülle einer sterilen graduierten Pipette auf.
- Entnehmen Sie zirka 1 ml Probe des Auswurfs mit der sterilen Pipette. Öffnen Sie die Plastikpackung mit dem SLsolution-Reagenzglas, entnehmen Sie ein Reagenzglas und schrauben Sie den Deckel auf.
- Übertragen Sie die Probeentnahme des Auswurfs in das offene Reagenzglas.
- Schrauben Sie den Deckel auf das SLsolution-Reagenzglas.
- Lassen Sie das Reagenzglas für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Eine längere Kontaktzeit bis zu 6 Stunden führt zu keiner Hemmwirkung für das Überleben von Bakterien und Pilzen in der Entnahmeprobe. Vortexten Sie das Reagenzglas für 30 Sekunden bei 2.000/2.500 U/min oder bis sich die Mischung verflüssigt hat. HINWEIS: Für besonders viskose Probeentnahmen könnte eine Mindestkontaktzeit über 15 Minuten erforderlich sein. Der Anwender muss die erfolgte Verflüssigung der Probeentnahme überprüfen
- Entnehmen Sie aseptisch eine flüssige Auswurfmenge und inokulieren Sie diese in einen geeigneten Nährboden für bakteriologische Kulturen.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Verwenden Sie während der Behandlung im Labor von klinischen Proben Latex-Schutzhandschuhe und –Kleidung gemäß den allgemein gültigen Normen.
- Umgebungsbedingungen, Timing und Qualität der entnommenen Proben für die Kultivierung sind sehr wichtig für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Befolgen Sie die empfohlenen Richtlinien für die Entnahme von Proben.
- Copan SLsolution wurde nicht für säurebeständige Bazillenkulturen getestet.
- Die Leistungskontrolle mit SLsolution Copan erfolgt mit Laborstämmen in Reagenzgläsern und nicht mit menschlichen Probeentnahmen.

Für die erfolgreiche Identifizierung der infektiösen Organismen ist die korrekte Entnahme der Probe am Patienten sehr wichtig. Für spezifische Hinweise in Bezug auf das Entnahmeverfahren der Proben konsultieren Sie die veröffentlichten Handbücher. Die Proben dürfen frühestens nach dem klinischen Auftreten der Krankheit entnommen werden. Der höchste Bakteriengehalt ist während der akuten Phase der Krankheit vorhanden.

HINWEISE

- Nicht wieder zurück in die Verpackung stecken
- Wenden Sie das System nicht für andere als die hier angegebenen Zwecke an.
- Der Gebrauch dieses Produkts mit Diagnosetests oder mit anderen Diagnose-Instrumenten muss vom Anwender vorher geprüft werden.
- Bei sichtbaren Schäden nicht benutzen.
- Den Nährboden nicht verzehren.
- Befolgen Sie strengstens die Anweisungen. Der Hersteller lehnt jede Verantwortung für Schäden ab, die durch die Anwendung des Produkts vonseiten nicht qualifizierter oder unbefugter Personen verursacht wurden.
- Das Produkt darf nur von entsprechend geschultem Personal angewendet werden.
- Sie müssen davon ausgehen, dass alle Proben infektiöse Mikroorganismen enthalten, daher müssen diese mit angemessener Vorsicht gehandhabt werden. Nach der Verwendung müssen die Reagenzgläser gemäß den Laborvorschriften als infektiöse Abfälle entsorgt werden.
- ⊗ Copan SLsolution ist ein Einweg-Produkt. Die Wiederbenutzung könnte Infektionen und/oder falschen Diagnosen verursachen.
- Die SLsolution Copan ist nur für die In-vitro-Diagnose bestimmt und darf keinesfalls zu Behandlungszwecken oder als prophylaktisches Arzneimittel verwendet werden.

ABFALLENTSORGUNG

Unbenutzte Reagenzgläser gelten als nicht gefährliche Abfälle und sind entsprechend zu entsorgen. Benutzte Reagenzien und jegliches verschmutztes Einwegmaterial ist gemäß den betreffenden Verfahren für infektiöse oder stark infektiöse Produkte zu behandeln. Jedes Labor muss dafür sorgen, dass Abfälle und erzeugte Abwässer gemäß ihren Merkmalen und Gefährlichkeitsgrad behandelt und gemäß den geltenden Richtlinien bearbeitet und entsorgt (bzw. von Dritten behandelt und entsorgt) werden.

MERKMALE DER LEISTUNG

Eine Untersuchung über das Überleben von Atemweg-Pathogenen in künstlichen Proben (siehe folgende Liste), die 6 Stunden bei Raumtemperatur nach der Homogenisierung mit SLsolution aufbewahrt wurden, hat gezeigt, dass der Organismus lebendig und reaktivierbar bleibt.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Haemophilus influenzae ATCC 10211
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Moraxella catarrhalis ATCC 25238
Candida albicans ATCC 10231

TESTERGEBNISSE ÜBER DIE LEISTUNG

STÄMME	ZÄHLUNG NULLZEIT CFU	CFU-ZÄHLUNG NACH 6 STUNDEN BEI RAUMTEMPERATUR
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	396	167
Haemophilus influenzae ATCC 10211	320	88
Staphylococcus aureus ATCC 6538	285	270
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	350	184
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	466	178
Moraxella catarrhalis ATCC 25238	501	37
Candida albicans ATCC 10231	275	260

Verfahren für den SLsolution-Test:

- Mit einer frischen Kultur in der Schale wird eine Suspension 0,5 Mc Farland vorbereitet, in welcher der in PBS zu analysierende Organismus inokuliert wurde.
- Geeignete Verdünnungen in PBS der ursprünglichen Inokulation mit 0,5 McF vorbereiten, um ein verdünntes Produkt mit 2.000 bis 20.000 CFU/100 µl zu erhalten.
- Mit einer Mikropipette, 100 µl der gewählten Verdünnung entnehmen und in das Reagenzglas mit der SLsolution inokulieren.
- Das Reagenzglas 30 Sekunden schütteln.
- 100 µl inokulierte SLsolution auf eine Kulturschale geben.
- Die Kulturschale bei 35°C für 48 Stunden inkubieren lassen, um eine Kulturschale mit Null-Zeit-Zählung zu erhalten.
- Das inokulierte SL-Reagenzglas bei Raumtemperatur 6 Stunden aufbewahren.
- Das inokulierte Reagenzglas 30 Sekunden schütteln.
- 100 µl inokulierte SLsolution auf einer Kulturschale verteilen.
- Die Kulturschale bei 35°C für 48 Stunden inkubieren lassen, um eine Kulturschale mit Null-Zeit-Zählung zu erhalten.
- Das inokulierte Reagenzglas 30 Sekunden schütteln und 100 µl auf die Kulturschale geben, um 6 Stunden zu erreichen, und das ganze bei 35°C für 48 Stunden inkubieren lassen.

ANNAHMETAGLICKEITSGRENZWERTE: >10 CFU/ Petrischale nach 6 Stunden bei Raumtemperatur.

Copan SL solution – Présentation et utilisation du produit

FRANÇAIS

EMPLOI PRÉVU

Copan SLsolution (solution pour la liquéfaction de l'expectoration) est un produit prêt à l'emploi. La solution est composée d'un agent mucolytique pour la liquéfaction des échantillons d'expectoration ; elle est utilisée avant le semis et le rayage pour isoler les bactéries et les champignons qui causent des infections de la portion respiratoire.

SOMMAIRE

La solution SL Copan est une solution de phosphate tamponnée de dithiothréitol (DTT). La solution DTT composant un format liquide prêt à l'emploi, est utilisée pour la dilution enzymatique des échantillons d'expectoration avant la culture. La solution SL Copan a été homologuée pour être utilisée avec Copan Walk-Away Specimen Processor (WASP), un système automatisé pour la semis et le rayage d'échantillons sur des plaques de culture de terrain. Copan est disponible en différentes configurations : dans un paquet entier qui comprend plusieurs tubes à essai à bouchon à vis contenant 1 ml de solution DTT ou dans un kit composé d'un tube à essai à bouchon à vis contenant 1 ml de solution DTT stérile et une pipette Pasteur jetable ou un Sputum Dipper (petite louche pour expectoration) pour transférer l'expectoration. Toutes les solutions SL sont emballées dans une pochette en plastique servant de barrière de protection qui maintient une atmosphère modifiée pour la stabilité et l'activité du réactif DTT pendant la durée du produit jusqu'à la date d'expiration ou au moment de l'utilisation.

RÉACTIFS

Composants solution SL:

DTT (dithiothréitol) 1mg
PBS (solution de phosphate tamponnée) 1ml



Copan Italia S.p.A. Via Perotti, 10 – 25125 BRESCIA – Italy Tel.: ++39 030 2687211–Fax: ++39 030 2687206 E-mail: info@copanitalia.com – Web site: www.copanitalia.com

PRÉCAUTIONS

- Pour un emploi diagnostique in vitro.
- Observer les précautions approuvées relatives aux matériaux biologiques potentiellement dangereux et aux techniques en aseptie. L'emploi doit être limité au personnel formé et qualifié comme il se doit.
- Tous les échantillons et les matériels utilisés pour analyser le produit doivent être considérés potentiellement infectés et donc gérés de sorte à éviter tout risque d'infection du personnel de laboratoire. Après l'emploi, stériliser tous déchets potentiellement dangereux y compris les échantillons, les conteneurs et les terrains de transport.
- S'en tenir rigoureusement aux instructions.

CONSERVAZIONE

Ce produit est prêt à l'emploi et ne requiert pas d'autres préparations. Le paquet entier non ouvert ou le kit individuel peut être conservé à une température de 5 - 25°C jusqu'au moment de l'utilisation ou à la date d'expiration. Ne pas surchauffer. Ne pas incuber ou congeler avant l'emploi. Une conservation inappropriée détermine une perte d'efficacité. Ne pas utiliser après la date d'expiration indiquée sur l'emballage externe et interne. L'emballage de la solution SL est constitué d'un film plastique utilisé comme barrière de protection. L'intérieur de la pochette contient une atmosphère modifiée pour maintenir la stabilité du produit. Dès que celle-ci est ouverte, il faut utiliser immédiatement la solution ou la conserver à 2-8°C puis l'utiliser dans les 24 heures. Une coloration du réactif DTT légèrement jaunâtre n'indique pas une détérioration du produit.

DÉTÉRIORATION DU PRODUIT

Ne pas utiliser **Copan SLsolution** si : (1) le produit présente des signes visibles d'endommagement ou de contamination ; (2) il y a des signes évidents de pertes ; (3) la date d'expiration est dépassée (4) la pochette a été ouverte il y a plus de 24 heures et n'a pas été conservée au réfrigérateur (5) présence d'autres signes de détérioration.

MATÉRIELS FOURNIS

Catalogue N.	Description du produit	Emballage	Approprié pour l'automatisation
097CE 097CE.A	Solution SL Copan en paquet entier : - 12X80 mm tubes à essai en polypropylène à bouchon à vis, à forme conique interne contenant 1 ml de solution DTT en phase liquide	30 unités par emballage 10x30 unités par boîte	Oui
095CE 095CE.A	Copan SLsolution Kit: - 12X80 mm tubes à essai en polypropylène à bouchon à vis, à forme conique interne contenant 1 ml de solution DTT en phase liquide - Une pipette stérile Pasteur pour transférer l'échantillon d'expectoration	20 unités par emballage 10x20 unités par boîte	Oui
099CE.A	Solution SL Copan en paquet entier : - 12X80 mm tubes à essai en polypropylène à bouchon à vis, à forme conique interne contenant 0.5 ml de solution DTT en phase liquide	30 unités par emballage 10x30 unités par boîte	Oui

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS :

Matériels appropriés pour la culture et l'isolation de bactéries et de champignons. Se reporter aux manuels de laboratoire pour connaître le protocole recommandé pour la culture et les techniques d'identification.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

Solution SL en paquet entier :

1. Ouvrir le paquet en plastique contenant les tubes à essai avec la solution SL, prendre un tube et dévisser le bouchon.
 2. Transférer le prélèvement d'expectoration dans le tube ouvert. Meilleures résultats s'obtiennent en transférant l'échantillon dans la solution SL à un rapport volumétrique d'environ 1 : 1
 3. Revisser le bouchon sur le tube de solution SL.
 4. Laisser le tube à température ambiante pendant au moins 15 minutes. Un temps de contact prolongé jusqu'à 6 heures ne détermine pas une action inhibitrice pour la survie des bactéries et des champignons dans le prélèvement. Vortexer le tube pendant 30 secondes à 2000/2500 tours/min jusqu'à ce que le mélange se soit liquéfié.
- NOTA : les échantillons particulièrement visqueux pourraient exiger un temps de contact minimum supérieur à 15 minutes. L'opérateur doit vérifier que l'échantillon s'est effectivement liquéfié
5. Prélever aseptiquement des échantillons d'expectoration et inoculer sur un terrain approprié pour la culture bactériologique.

Kit de la solution SL avec pipette stérile Pasteur:

1. Déchirer la pochette d'une pipette stérile graduée.
 2. Prélever environ 1ml d'échantillon d'expectoration à l'aide de la pipette stérile. Ouvrir la pochette contenant le tube à essai avec la solution SL, prendre le tube et desserrer le bouchon
 3. Transférer le prélèvement d'expectoration dans le tube ouvert
 4. Visser le bouchon sur le tube de solution SL
 5. Laisser le tube à température ambiante pendant au moins 15 minutes. Un temps de contact prolongé jusqu'à 6 heures ne détermine pas une action inhibitrice pour la survie des bactéries et des champignons dans le prélèvement. Vortexer le tube pendant 30 secondes à 2000/2500 tours/min jusqu'à ce que le mélange se soit liquéfié.
- NOTA : les échantillons particulièrement visqueux pourraient exiger un temps de contact minimum supérieur à 15 minutes. L'opérateur doit vérifier que l'échantillon s'est effectivement liquéfié
6. Prélever aseptiquement des échantillons d'expectoration et inoculer sur un terrain approprié pour la culture bactériologique.

RESTRICTIONS

- Pendant le traitement, en laboratoire, des échantillons cliniques, porter des gants en latex et des vêtements de protection conformément aux normes universelles.
- Les conditions, la rapidité et la quantité des échantillons prélevés pour la culture sont extrêmement importantes pour obtenir des résultats fiables. Suivre les lignes guide recommandées pour collecter les échantillons.
- Copan SLsolution n'est pas testée pour la culture de bacilles acide-résistants.
- La vérification de la performance avec la solution SL Copan a été effectuée en utilisant des souches de laboratoire en tube à essai et non pas sur des échantillons humains.

Pour l'isolation et l'identification de succès des organismes infectieux, le prélèvement correct de l'échantillon du patient est extrêmement important. Pour les indications spécifiques concernant les procédures de collecte des échantillons, consulter les manuels de référence publiés. Les échantillons doivent être collectés le plus tôt possible après le début clinique de la maladie. Les titres bactériens les plus élevés sont présents pendant la maladie aiguë.

AVERTISSEMENTS

- Ne pas remettre dans l'emballage
- Ne pas utiliser pour des applications différentes de l'emploi établi.
- L'utilisation de ce produit associée à des tests diagnostics ou à une instrumentation diagnostique quelconque devrait être validée par l'utilisateur avant l'emploi.
- Ne pas utiliser le produit s'il est visiblement endommagé.
- Ne pas ingérer le terrain.
- S'en tenir rigoureusement aux instructions. Le producteur décline toute responsabilité dérivant de l'emploi du produit de la part de personnes non autorisées et non qualifiées.
- L'utilisation du produit doit être limitée uniquement à un personnel formé comme il se doit.
- Comme on suppose que tous les échantillons contiennent des micro-organismes infectieux, il faut les manipuler avec les précautions appropriées. Après l'emploi, il faut éliminer les tubes à essai conformément aux règlements de laboratoire comme tout déchet infecté.
-  Copan SL solution est un produit jetable ; la réutilisation pourrait causer un risque d'infection et/ou un diagnostic incorrect.
- La solution SL Copan est utilisée seulement pour l'emploi diagnostique in vitro et n'est aucunement destinée à un but curatif ou prophylactique.

ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Les réactifs non utilisés peuvent être considérés comme des déchets non dangereux et être éliminés comme ces derniers. Il faut traiter les réactifs utilisés et tout autre matériel jetable contaminé, conformément aux procédures relatives aux produits infectés ou potentiellement infectés. Le laboratoire doit traiter les déchets et les effluents selon leur nature et degré de dangerosité ; de toute manière, ils doivent être traités et éliminés (éventuellement par des tiers) conformément aux réglementations en vigueur.

CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE

Une enquête sur la survie des pathogènes respiratoires dans des échantillons forcés, énumérés ci-dessous, conservés à température ambiante pendant 6 heures après l'homogénéisation avec la solution SL, a démontré que l'organisme est encore vital et peut être remis en culture ;

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Haemophilus influenzae ATCC 10211
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Moraxella catarrhalis ATCC 25238
Candida albicans ATCC 10231

RÉSULTATS DE L'ESSAI SUR LA PERFORMANCE

SOUCHES	COMPTAGE TEMPS ZÉRO CFU	CFU COMPTAGE APRÈS 6 HEURES À TEMPÉRATURE AMBIANTE
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	396	167
Haemophilus influenzae ATCC 10211	320	88
Staphylococcus aureus ATCC 6538	285	270
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	350	184
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	466	178
Moraxella catarrhalis ATCC 25238	501	37
Candida albicans ATCC 10231	275	260

Procédure pour l'essai solution SL:

- En partant d'une culture fraîche sur plaque, on prépare une suspension 0.5 Mc Farland inoculum de l'organisme à analyser en PBS.
- Préparer des dilutions appropriées en PBS de l'inoculum original de 0,5 McF pour pouvoir obtenir une solution diluée, contenant de 2000 à 20000 CFU/100 ul.
- Avec une micropipette, prélever 100 ul. de la dilution choisie et inoculer dans le tube à essai avec la solution SL.
- Vortexer le tube inoculé pendant 30 secondes.



- Etendre 100 ul de solution SL inoculée sur une plaque de culture appropriée.
- Incuber la plaque à 35°C pendant 48 heures de sorte à obtenir une plaque à comptage de temps zéro.
- Maintenir le tube de solution SL inoculée à température ambiante pendant 6 heures.
- Vortexer le tube inoculé pendant 30 secondes.
- Distribuer 100 ul de solution SL inoculée sur une plaque de culture appropriée.
- Incuber la plaque à 35°C pendant 48 heures de sorte à obtenir le comptage après six heures.
- Vortexer le tube inoculé pendant 30 secondes et étendre 100 ul de sorte à obtenir le comptage après six heures puis incuber à 35°C pendant 48 heures.

LIMITES D'ACCEPTABILITÉ : >10 CFU/ plaque après six heures à température ambiante.

Copan SL solution – Descripción del producto & Cómo usar la guía

ESPANOL

USO PREVISTO

Copan SLSolution (solución para esputo líquido) es un agente mucolítico listo para el uso para muestras de esputo líquido antes del cultivo y del estudio para el aislamiento de bacterias y hongos que causan infecciones del tramo respiratorio.

RESUMEN

La solución Copan SL está constituida por una solución buferizada de fosfato de ditiotreitól (DTT). La solución DTT se suministra en un formato líquido listo para el uso y se prevé su uso para tomar muestras de esputo digestivo antes del cultivo. La solución Copan SL se ha validado para el uso con un Procesador de muestra libres Copan (WASP) en un sistema automatizado para el cultivo y el estudio de muestras en placas para medios de cultivo.

La solución Copan SL está disponible en varias configuraciones:

en paquetes múltiples que incluyen varios tubos con tapa de rosca llenados con 1 ml de solución DTT, y en juegos que incluyen un tubo con tapa de rosca que contiene 1 ml de solución DTT más una pipeta Pasteur estéril desechable como dispositivo de transferencia para el esputo. Todas las presentaciones de soluciones SL se han empacado con bolsas de película plástica de barrera que crean una atmósfera modificada para mantener la estabilidad y la actividad del reactivo DTT durante la vida prevista en el estante de los productos.

REACTIVOS

Componentes de la solución SL:

DTT (ditiotreitól) 1mg

PBS (solución buffer de fosfato) 1ml

PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Observar las precauciones para el peligro biológico y las técnicas asépticas aprobadas. Puede ser utilizada solamente por personal entrenado y capacitado.
- Todas las muestras y los materiales utilizados para el procesamiento deben considerarse potencialmente infecciosos y deben manipularse de manera de prevenir el contagio del personal de laboratorio. Esterilizar todas las muestras que incluyen desechos biológicamente peligrosos, los contenedores y los medios después de su uso.
- Hay que leer y seguir atentamente las instrucciones.

ALMACENAMIENTO

El presente producto está listo para el uso y no necesita de ulteriores preparaciones. El paquete múltiple o individual no abierto puede almacenarse a una temperatura de 5-25°C hasta el uso o hasta la fecha de vencimiento. No recalentar. No incubar o congelar antes del uso. Un almacenamiento impropio puede causar pérdida de efectividad. No utilizar después de la fecha de vencimiento, que se ha impreso claramente en la caja externa. El empaque de la solución SL incluye una película de plástico de barrera, que crea una atmósfera modificada en el interior del paquete, para mantener la estabilidad del producto. Después de la apertura del paquete el tubo (los tubos) de solución SL debe utilizarse inmediatamente o debe guardarse a 2-8°C y utilizarse dentro de 24 horas. Una coloración amarilla daña del reactivo DTT no indica ningún deterioro del producto.

DETERIORO DEL PRODUCTO

No usar **Copan SLSOLUTION** si: (1) el producto muestra marcas visibles de daños o contaminación; (2) hay evidencia de pérdidas; (3) se ha superado la fecha de vencimiento; (4) el paquete está abierto desde más de 34 horas y no se ha guardado en una nevera; (5) hay otros signos de deterioro.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Número catálogo	Descripción del producto	Tamaño del paquete	Apto para la automatización
097CE 097CE.A	Copan SLSolution en paquete múltiple: - tubos 12X80 mm de polipropileno con tapa de rosca y forma interna cónica llenados con 1ml de solución DTT en fase líquida	30 unidades por paquete de estante 10x30 unidades por caja	SÍ
095CE 095CE.A	Juego Copan SLSolution: - Un tubo de polipropileno 12X80 mm con tapa de rosca y forma interna cónica llenado con 1ml de solución DTT en fase líquida - Una pipeta Pasteur estéril para el traslado de la muestra de esputo	20 unidades por paquete de estante 10x20 unidades por caja	SÍ
099CE.A	Copan SLSolution en paquete múltiple: - tubos 12X80 mm de polipropileno con tapa de rosca y forma interna cónica llenados con 0.5 ml de solución DTT en fase líquida	30 unidades por paquete de estante 10x30 unidades por caja	SÍ

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Materiales apropiados para el cultivo y el aislamiento de bacterias y hongos. Referirse a los manuales de referencia de laboratorio para los protocolos recomendados para el cultivo y para las técnicas de identificación aconsejadas.

INSTRUCCIONES PARA EL USO

SLSolution en paquete múltiple:

1. Abrir el paquete de plástico que contiene los tubos de SLSolution, remover un tubo y destornillar la tapa.
2. Transferir la muestra de esputo en el tubo abierto. NOTA: pueden obtenerse mejores resultados transfiriendo la muestra en la solución SL respetando la proporción volumétrica de aproximadamente 1:1.
3. Volver a tapar el tubo de SLSolution.
4. ejar la probeta a temperatura ambiente durante por lo menos 15 minutos. Un tiempo de contacto prolongado de hasta 6 horas no determina una acción inhibitoria para la supervivencia de bacterias y hongos en la toma. Centrifugar la probeta durante 30 segundos a 2000/2500 rpm o hasta que la mezcla se haya licuado.
NOTA: para muestras especialmente viscosas, podría resultar necesario un tiempo de contacto mínimo superior a los 15 minutos. El operador tiene que comprobar la licuación de la muestra..
5. Remover asépticamente las partes de esputo líquido e inocularlas en un medio apropiado para el cultivo bacteriológico.

Juego SLSolution con pipeta Pasteur estéril:

1. Mantener abierta una pipeta graduada estéril.
2. Aspirar aproximadamente 1 ml de muestra de esputo en la pipeta. Abrir el paquete de plástico que contiene el tubo de SLSolution, remover un tubo y destornillar la tapa.
3. Transferir la muestra de esputo en el tubo abierto.
4. Volver a tapar el tubo de SLSolution
5. ejar la probeta a temperatura ambiente durante por lo menos 15 minutos. Un tiempo de contacto prolongado de hasta 6 horas no determina una acción inhibitoria para la supervivencia de bacterias y hongos en la toma. Centrifugar la probeta durante 30 segundos a 2000/2500 rpm o hasta que la mezcla se haya licuado.
NOTA: para muestras especialmente viscosas, podría resultar necesario un tiempo de contacto mínimo superior a los 15 minutos. El operador tiene que comprobar la licuación de la muestra.
6. Remover asépticamente las partes de esputo líquido e inocularlas en un medio apropiado para el cultivo bacteriológico.

LIMITACIONES

- En el laboratorio, ponerse guantes de látex u otras protecciones adecuadas para las precauciones universales de manipulación de muestras clínicas.
- Las condiciones, los tiempos y el volumen de la muestra recolectada para el cultivo son variables significativas para la obtención de resultados fiables del cultivo. Seguir las líneas guía recomendadas para la recolección de la muestra.
- La SLSolution Copan no se ha testado para el cultivo de los microorganismos resistentes a los ácidos.
- La prueba de prestaciones con la SOLUTION Copan sí ha sido conducida utilizando cepas de laboratorio introducidas en el tubo de SL Solution y no utilizando muestras humanas.

La toma de muestras adecuadas del paciente es extremadamente crítica para el aislamiento y la identificación exitosos de los organismos infecciosos. Para las líneas guía relativas a los procedimientos de toma de la muestra, consultar los manuales de referencia publicados. Las muestras tienen que ser tomadas lo más pronto posible después del inicio clínico de la enfermedad. Durante la fase aguda de la enfermedad está presente una actividad bacteriana más alto.

ADVERTENCIAS

- No volver a empacar.
- No apto para aplicaciones diferentes del uso previsto.
- El uso del presente producto en asociación con cualquier prueba diagnóstica o con cualquier instrumentación diagnóstica debe ser validada por el usuario antes del uso.
- No utilizar el producto si se encuentra visiblemente dañado.
- No ingerir el medio.
- Las instrucciones para el uso deben observarse atentamente. El constructor no puede considerarse responsable para cualquier uso no autorizado y no capacitado del producto.
- El producto tiene que ser manipulado solamente por personal entrenado.
- Hay que suponer que todas las muestras contienen micro-organismos infecciosos: por lo tanto todas las muestras deben manipularse con las precauciones adecuadas. Después del uso, los tubos deben eliminarse de acuerdo con las reglamentaciones de laboratorio para los residuos infecciosos.
- La solución SL es solamente para uso simple; la reutilización puede causar un riesgo de infecciones y/o resultados no precisos.
- La solución Copan SL es solamente para los diagnósticos in Vitro y no se ha previsto de ninguna forma para fines terapéuticos o profilácticos.

ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS

Los reactivos no utilizados pueden considerarse como residuos no peligrosos y pueden eliminarse consiguientemente.

Eliminar los reactivos usados, y de cualquier material desechable contaminado siguiendo los procedimientos previstos para los productos infecciosos o potencialmente infecciosos. Es responsabilidad de cada laboratorio manipular los residuos y los productos derivados de acuerdo a su naturaleza y grado de peligrosidad y tratarlos y eliminarlos (o hacerlos tratar y eliminar) de conformidad con todas las directivas aplicables.

PRESTACIONES CARACTERÍSTICAS:

Una investigación de la supervivencia de los agentes patógenos respiratorios indicada a continuación en muestras observadas que se han almacenado durante 6 horas a temperatura ambiente después de la homogeneización con SL Solution ha mostrado que los siguientes organismos quedaban viables y sometibles a cultivo:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Haemophilus influenzae ATCC 10211
Stafilococcus aureus ATCC 6538
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Moraxella catarrhalis ATCC 25238
Candida albicans ATCC 10231

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PRESTACIONES

CEPA	CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS TIEMPO CERO	CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DESPUÉS DE 6 HORAS A LA TEMPERATURA AMBIENTE
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	396	167
Haemophilus influenzae ATCC 10211	320	88
Stafilococcus aureus ATCC 6538	285	270
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	350	184
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	466	178
Moraxella catarrhalis ATCC 25238	501	37
Candida albicans ATCC 10231	275	260

Procedimiento para probar la solución SL:

- Empezando de un cultivo fresco de organismo de prueba preparar 0,5 de inóculo Mc Farland del organismo de prueba en suspensión buffer fosfato.
- preparar diluciones adecuadas en suspensión buffer fosfato de inóculo original 0,5 Mdf para obtener un inóculo diluido que contiene de 2000 a 20000 unidades formadoras de colonias/100 ul
- con una micropipeta introducir 100 ul de la dilución escogida en un tubo de SL Solution.
- centrifugar el tubo inoculado durante 30 segundos
- extender 100 ul de SL Solution inoculada en una placa de cultivo adecuada
- incubar la placa a 35°C durante 48 horas para obtener una placa de conteo de tiempo cero
- mantener los tubos de SL inoculados durante 6 horas a temperatura ambiente
- centrifugar el tubo inoculado durante 30 segundos
- extender 100 ul de SL Solution inoculada en una placa de cultivo adecuada
- incubar la placa a 35°C durante 48 horas para obtener una placa de conteo de seis horas
- centrifugar durante 30 segundos y extender 100 ul para obtener una placa de seis horas, e incubarla a 35°C durante 48 horas.

LÍMITES DE ACEPTACIÓN: >10 Unidades formadoras de colonias/placa después de seis horas a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAPHY

- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger and W.C. Winn, Jr. 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J.B. Lippincott Co. Philadelphia, PA.
- Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. 1999. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM, Washington, D.C..
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Quality Control of Microbiological Transport Systems. Approved Standard M40-A.
- 42CFR72. Code of Federal Regulations, Title 42, Volume 1, Part 72. Interstate Shipment of Etiologic Agents.
- Miller, J. M. 1999. A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology, 2nd ed. ASM, Washington, DC.
- Isenberg, H. D., 2004. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. ASM, Washington, DC.
- Isenberg, H.D., 1998. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Chapter 14.12, Page 787. Packaging and Shipping Infectious Substances.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1994. Procedures for Handling and Transport of Diagnostic Specimens and Etiologic Agents. Approved Standard H5-A3.

Tabella dei Simboli/Index of Symbols/Table des Symboles/Symbole/Tabla de Símbolos/ Quadro de Símbolos

Symbol/Symbole/Simbolo	Significato/Meaning Signification/Bedeutung/Significado/ Significado
	Fabbricante/ Manufacturer/Fabricant/Hersteller/Fabricante/ Fabricante
	In Vitro Diagnostic
	Non riutilizzare/Do not reuse/Ne pas réutiliser/Nicht zur Wiederverwendung/No reutilizar/ Não voltar a usar
	Numero di catalogo/Catalogue number/Référence du catalogue/Bestellnummer/Número de catálogo/ Referência do catálogo
	Limiti di temperatura/Temperature limitation/Limites de temperature/Temperaturbegrenzung/Limites de temperatura/ Limites de temperatura
	Utilizzare entro/Use by/Utiliser jusque/Verwendbar bis/Fecha de caducidad/ Prazo de validade
	Consultare le istruzioni per l'uso/Consult Instructions for Use/Consulter les instructions d'utilisation/Gebrauchsanweisung beachten/Consulte las instrucciones de uso/ Consultar as instruções de utilização
	Strappare per aprire/Peel/Décoller/Abziehen/Desprender/ Destacável
	Codice del lotto (partita)/ Batch code (Lot)/Code de lot (Lot)/Chargencode (Chagenbezeichnung)/Código de lote (Lote)/ Código do lote (Lote)
	Contenuto sufficiente per <n> test/Contains sufficient for <n> tests/Contenu suffisant pour <n> tests/Ausreichend für <n> Tests/Contenido suficiente para <n> pruebas/ Contém suficiente para <n> testes
 Copen Italia Spa Via Perotti, 10 Brescia, Italy	 Copen Italia Spa Via Perotti 10 25125 Brescia Italy Tel: +39 030 2687211 Fax: +39 030 2687250 E-mail: info@copenitalia.com Website: www.copeninnovation.com