

**УТВЕРЖДЕНА**

Приказом Росздравнадзора

от \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

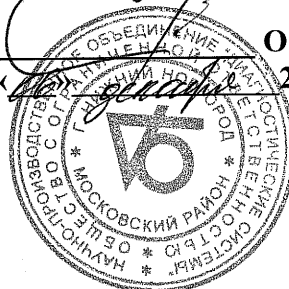
№ \_\_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

Заместитель генерального директора  
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»

О.Н.Шлюндин

2010 г.



**ИНСТРУКЦИЯ**  
по применению набора реагентов  
«ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24»

**Тест-система для биохимической  
идентификации и дифференциации энтеробактерий**

**Набор № 1**

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ

«НИСР им. Л. А. Тарасевича»

Минздравсоцразвития России



И. В. Борисевич

2010 г.

## Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24».....	3
III. Меры предосторожности .....	3
IV. Инструкции по безопасности.....	4
V. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые с набором реагентов	4
VI. Отбор и подготовка образцов .....	5
VII. Проведение анализа.....	5
VIII. Учет результатов.....	6
IX.. Срок годности. Условия хранения и транспортировки.....	7
X. Объяснение символов.....	8

Набор рассчитан на идентификацию и дифференциацию до вида по 24-м биохимическим признакам 24 штаммов микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных в ходе бактериологического анализа.

Возможно дробное 24-ти кратное использование набора на протяжении срока его годности

### I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24 предназначен для фенотипической идентификации микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделяемых в ходе бактериологического анализа, в течение 24 часов. Тест-система позволяет определить следующие биохимические свойства энтеробактерий: утилизацию цитрата натрия, малоната натрия, инозита, сорбита, маннита, адонита, дульцита, глюкозы, лактозы, сахарозы, арабинозы, мальтозы, рамнозы, трегалозы, гидролиз эскулина, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), наличие уреазы,  $\beta$ -галактозидазы, декарбоксилаз орнитина и лизина, дезаминазы фенилаланина, дигидролазы аргинина. Тест-система может быть использована в медицинской и ветеринарной практике.

### II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Планшеты полистироловые 96-луночные разборные, на дно лунок которых нанесены соответствующие субстратно-индикаторные питательные среды, стабилизированные поливиниловым спиртом. Цвет субстрата в лунке зависит от применяемого индикатора и рН субстрата.	6 шт.
0,85% раствор натрия хлорида рН от 6,7 до 7,2, стерильный. Прозрачная бесцветная жидкость.	40,0 мл - 3 фл.
Масло вазелиновое, стерильное. Прозрачная вязкая жидкость с желтоватым оттенком.	10,0 мл - 1 фл.
Реактив для теста «индол» (пара-диметиламинобензальдегида раствор 3,5%). Прозрачная светло – желтого цвета жидкость.	4,5 мл - 1 фл.
Реактив для теста «фенилаланин» (железа хлорида (III) гексагидрата раствор 10%). Прозрачная желтого или оранжевого цвета жидкость.	3,0 мл - 1 фл.
Реактив 1 для теста «АМК» ( $\alpha$ -нафтола раствор 12%). Прозрачная розового или красно-коричневого цвета жидкость.	3,0 мл - 1 фл.
Реактив 2 для теста «АМК» (калия гидроксида раствор 40%) Прозрачная бесцветная жидкость.	3,0 мл - 1 фл.

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно в состав набора входят:

Крышка-капельница для флакона с вазелиновым маслом	1 шт.
Крышка для планшета стерильная	1 шт.
Полиэтиленовый пакет	6 шт.
Бланк учета результатов	6 шт.
Таблица биохимических свойств энтеробактерий	1 шт.
Кодовые карточки	24 шт.

### III. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

• Набор тест-системы не содержит в своем составе каких-либо опасных биологических агентов.  
Компоненты тест-системы: реактив для теста «индол» (содержит 80% этанол и 1,75 М соляную

кислоту), реактив 1 для теста «АМК» (содержит 96% этанол, 12 %  $\alpha$ -нафтол), реактив 2 для теста «АМК» (содержит 40% калия гидроксид) являются ЛВЖ, ядовитыми и едкими веществами. При работе необходимо соблюдать правила личной гигиены и меры предосторожности: работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом, работу с реактивами проводить вдали от открытого огня.

- Работы в лаборатории, связанные с идентификацией энтеробактерий проводить с соблюдением требований санитарно-эпидемиологического режима, в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Пробирки с культурами и использованные планшеты обезвреживать автоклавированием в паровом стерилизаторе в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кг/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) или замачивать на 24 ч в 3 % раствор хлорамина Б или 3 % раствор перекиси водорода с 0,5 % СМС. Допустимо применение другого разрешенного к использованию дез. средства. Крышку для планшета 2 раза протереть 70 % этиловым спиртом. После обезвреживания дез. раствором рамку планшета и крышку можно использовать повторно. Микродозаторы до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

#### IV. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для диагностики «in vitro».
- При работе с реагентами набора и исследуемыми образцами необходимо использовать лабораторную одежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Соблюдать меры предосторожности при работе со спиртовкой или газовой горелкой.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы.
- При расплескивании образцов или растворов, содержащих образцы необходимо протереть поверхность раствором гипохлорита натрия, разведенным до 10%. Используемый материал должен быть сброшен в контейнер для загрязненных отходов.

#### V. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Термостат, поддерживающий температуру (37,0 ± 0,5) °С;
- пипетки стерильные стеклянные концевые калиброванные 2 класса точности на 1 мл и 5 мл или дозаторы пипеточные переменного объема одноканальные (с погрешностью измерения не более 5%), со стерильными наконечниками;
- пробирки стеклянные, стерильные;
- отраслевой стандартный образец мутности бактериальной взвеси стеклянный СОС 42-28-86-06 П (5МЕ) или 2 степени по шкале MacFarland.
- спиртовка, бактериологические петли.
- При необходимости проведения проверки функциональности набора следует использовать контрольные штаммы из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Характеристика свойств контрольных штаммов представлена в таблице 2.

Таблица 2

**Характеристика контрольных штаммов**

№	Тесты	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №579	<i>Escherichia coli</i> №1882	<i>Enterobacter cloacae</i> №1903	<i>Proteus vulgaris</i> HX19 №222
А	Утилизация цитрата натрия	+	-	+	±
В	Утилизация малоната натрия	+	-	+	-
С	Гидролиз эскулина	+	-	-	+

D	Наличие лизиндекарбоксилазы	+	+	-	-
E	Наличие аргининдигидролазы	-	+	+	-
F	Наличие орнитиндекарбоксилазы	-	+	+	-
G	Образование сероводорода	-	-	-	+
H	Наличие фенилаланиндезаминазы	-	-	-	+
A	Образование ацетилметилкарбинола	+	-	+	-
B	Образование индола	-	+	-	+
C	Утилизация глюкозы	+	+	+	+
D	Наличие $\beta$ -галактозидазы	+	+	+	-
E	Утилизация лактозы	+	+	+	-
F	Утилизация маннита	+	+	+	-
G	Утилизация сахарозы	+	-	+	+
H	Утилизация инозита	+	-	-	-
A	Утилизация сорбита	+	+	+	-
B	Утилизация арабинозы	+	+	+	-
C	Утилизация мальтозы	+	+	+	+
D	Утилизация адонита	+	-	-	-
E	Утилизация трегалозы	+	+	+	-
F	Утилизация рамнозы	+	+	+	-
G	Утилизация дульцита	+	-	-	-
H	Наличие уреазы	+	-	$\pm$	+

## VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Исследование проводить с чистой культурой, после определения принадлежности к семейству Enterobacteriaceae (грамотрицательные, оксидазоотрицательные палочки, утилизирующие глюкозу в аэробных и анаэробных условиях по тесту Хью-Лейфсона, подвижные и неподвижные).

Для работы использовать культуры, выращенные от 18 до 24 ч при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  на поверхности питательного агара: СПА, МПА, ГРМА, Мартеновский или Хоттингера (можно с добавлением 5 % крови). Если культура микроорганизма находилась какое-либо время на хранении при комнатной температуре или в холодильнике, произвести предварительный посев ее в питательный бульон на 2-4 ч при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , затем осуществить пересев культуры на поверхность питательного агара и инкубировать от 18 до 24ч.

Стерильной пипеткой отмерить по 4,0 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида рН от 6,7 до 7,2 из флакона в стерильные пробирки (по количеству исследуемых культур). Из суточной агаровой культуры приготовить суспензию в 0,85% растворе натрия хлорида, подогретом до температуры 30-35  $^\circ\text{C}$ . Густоту суспензии довести до 5 единиц по отраслевому стандартному образцу мутности бактериальных взвесей, стеклянному, или второй степени по шкале McFarland. Приготовленную микробную суспензию до начала исследования хранить не более 30 мин.

## VII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Вскрыть пакет с маркировкой «первый ряд (синий стрип)» по линии запайки со стороны замка. Вынуть из пакета планшет, оставить в рамке необходимое количество стрипов (по количеству исследуемых культур). Стрипы с питательными субстратами, не используемые для данной постановки, вынуть из рамки и поместить в пакет, закрыв пакет на замок. Аналогично вскрыть пакеты с маркировкой «второй ряд (черный стрип)», «третий ряд (желтый стрип)», вынуть необходимое количество стрипов и поместить в рамку, оставшиеся рамки со стрипами закрыть в пакетах на замок. Для испытания одной культуры необходимо взять 3 стрипа (синий, черный, желтый). Для удобства в работе и исключения ошибок при внесении микробной суспензии стрипы можно плотно не сдвигать.

2. На прилагаемом к набору бланке учета результатов зарегистрировать номера испытуемых культур.

3. Внести стерильно пипеткой по 0,1 мл микробной суспензии одной культуры в лунки 3-х стрипов (синий, черный, желтый). Тесты расположены в направлении А-Н (три стрипа – один анализ); возможно применение автоматического пипеточного дозатора с использованием наконечников с защитными фильтрами.

4. Для создания анаэробных условий добавить стерильной пипеткой стерильное вазелиновое масло: по 3 капли из флакона с крышечкой-капельницей в тесты с лизином, аргинином, орнитинном (лунки D, E, F синего стрипа), с индолом (лунка В черного стрипа), с мочевиной (лунка Н желтого стрипа) и по 5 капель из флакона с крышечкой-капельницей в тест с сероводородом (лунка G синего стрипа).

5. Накрыть планшет крышечкой и поместить его в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или использовать полиэтиленовый пакет, завернув при этом край пакета вниз.

6. Планшет инкубировать при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  до 24 часов.

### VIII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Учет результатов проводить визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) после инкубации до 24 часов. Учет теста на обнаружение β-галактозидазы проводить дважды: через 4 часа и после инкубации до 24 часов, т.к. у некоторых штаммов лимонно-желтое окрашивание по окончании инкубации бледнеет или совсем исчезает.

По окончании инкубации добавить в лунки А черного стрипа по 0,05 мл (или 1 каплю из флакона-капельницы) реактив 1 для теста «АМК» и 0,05 мл (или 1 каплю из флакона-капельницы) реактив 2 для теста «АМК». Планшет накрыть крышечкой и инкубировать 30 минут при комнатной температуре. Затем внести в лунки В черного стрипа по 0,075 мл (или 1-2 капли из флакона-капельницы) реактив для теста «индол»; в лунки Н синего стрипа по 0,05 мл (или 1 каплю из флакона-капельницы) реактив для теста «фенилаланин». Немедленно провести учет результатов по критериям цветового указателя (таблица 3), так как темно-зеленый цвет при положительном значении в тесте «фенилаланин» пропадает в течение 2 минут.

Таблица 3

#### Цветовой указатель

Название теста	Цвет растворенного субстрата	Критерии оценки		
		Положительный результат	Отрицательный результат	
Смена окраски субстрата на:				
<b>Первый ряд (синий стрип)</b>				
А	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
В	Утилизация малоната натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
С	Гидролиз эскулина	Желтоватый	Черный, темно-коричневый	Желтоватый, светло-коричневый
Д	Наличие лизиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
Е	Наличие аргинин-дигидролазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
F	Наличие орнитиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
G	Образование сероводорода	Желтоватый	Черный, темно-серый	Желтоватый, светло-серый
Н	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Зеленый, темно-зеленый	Желтый

<b>Второй ряд (черный стрип)</b>				
A	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный, желтоватый	Ярко-розовый, брусничный	Желтоватый, светло-розовый
B	Образование индола	Бесцветный	Розовый	Лимонно-желтый
C	Утилизация глюкозы	Красный	Желтый	Красный
D	Наличие $\beta$ -галактозидазы	Бесцветный	Лимонно-желтый	Бесцветный
E	Утилизация лактозы	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
F	Утилизация маннита	Красный	Желтый	Красный
G	Утилизация сахарозы	Красный	Желтый	Красный
H	Утилизация инозита	Красный	Желтый	Красный
<b>Третий ряд (желтый стрип)</b>				
A	Утилизация сорбита	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
B	Утилизация арабинозы	Красный	Желтый	Красный
C	Утилизация мальтозы	Красный	Желтый	Красный
D	Утилизация адонита	Красный	Желтый	Красный
E	Утилизация трегалозы	Красный	Желтый	Красный
F	Утилизация рамнозы	Красный	Желтый	Красный
G	Утилизация дульцита	Красный	Желтый	Красный
H	Наличие уреазы	Желтый	Малиновый, красный	Желтый, оранжевый

б) Последующую идентификацию культур микроорганизмов проводить с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий (прилагается).

Возможна автоматизированная процедура идентификации микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae с использованием «Программного обеспечения для автоматизированной идентификации бактерий» производства ООО «НПО «Диагностические системы», которое позволяет идентифицировать энтеробактерии как методом кодов (при типичном поведении штаммов), так и методом расстояний на основе кластерного анализа (при атипичном поведении штаммов). «Программное обеспечение» в набор не входит.

Для определения сероварианта выделяемых патогенных энтеробактерий (шигелл, сальмонелл, эшерихий, иерсиний) необходимо провести серотипирование со специфическими агглютинирующими сыворотками в реакции агглютинации на стекле.

## **IX. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ**

Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат использованию не подлежит.




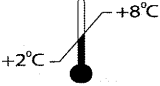


Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С в течение 10 сут. Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора, оставшиеся не использованными реагенты хранить: 0,85% раствор натрия хлорида, масло вазелиновое, реактив для теста «индол», реактив для теста «фенилаланин», реактив 1 для теста «АМК», реактив 2 для теста «АМК», планшет или стрипы с дифференцирующими субстратами в пакете, тщательно закрытым на замок Zip-Lock - в течение срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.



Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (499) 241-39-22, факс: (499) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

## Х.ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/СЕ по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата /месяц/ год
	Используйте инструкцию по применению

Директор по производству  
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»



В.К. Пименов