

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-12»

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

Набор № 2

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ
«ГИСК им. Л. А. Тарасевича»
Минздравсоцразвития России

И. В. Борисевич
2010 г.



Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12».....	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.....	5
IX. Срок годности. Условия хранения и транспортировки.....	6
X. Объяснение символов.....	7

Набор рассчитан на идентификацию и дифференциацию до вида по 12-и биохимическим признакам 24 штаммов микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных в ходе бактериологического анализа.

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

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12» предназначен для фенотипической идентификации микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделяемых в ходе бактериологического анализа, в течение 18-24 часов. Тест-система позволяет определить следующие биохимические свойства энтеробактерий: утилизацию цитрата натрия, малоната натрия, инозита, сорбита, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), наличие уреазы, β-галактозидазы, декарбоксилаз орнитина и лизина, дезаминазы фенилаланина. Тест-система может быть использована в медицинской и ветеринарной практике.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12»

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 pH субстрата.	3 шт.
0,85% раствор натрия хлорида pH от 6,7 до 7,2, стерильный. Прозрачная бесцветная жидкость.	40,0 мл – 2 фл.
Масло вазелиновое, стерильное. Прозрачная вязкая жидкость с желтоватым оттенком.	9,0 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» (α-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	3 шт.
Бланк учета результатов	3 шт.
Таблица биохимических свойств энтеробактерий	1 шт.
Каталог кодов	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 1,75М соляную кислоту), реактив 1 для теста «АМК» (содержит 96 % этанол, 12 % α-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 °С до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (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 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 ОСО 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. Тарасевича. Характеристика свойств контрольных тест-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
1	Утилизация цитрата натрия	+	-	+	±
2	Образование сероводорода	-	-	-	+
3	Наличие β-галактозидазы	+	+	+	-
4	Наличие фенилаланиндезаминазы	-	-	-	+
5	Наличие лизиндекарбоксилазы	+	+	-	-

6	Наличие орнитиндекарбоксилазы	-	+	+	-
7	Образование индола	-	+	-	+
8	Утилизация малоната натрия	+	-	+	-
9	Наличие уреазы	+	-	±	+
10	Утилизация сорбита	+	+	+	-
11	Утилизация инозита	+	-	-	-
12	Образование ацетилметилкарбинола	+	-	+	-

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 2,5 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. Вынуть из пакета планшет, расположить его на столе. Для испытания одной культуры необходимо взять 1 стрип. Стрипы, оставшиеся неиспользованными, вынуть из рамки и поместить в пакет, пакет плотно закрыть на защелку. 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 одного горизонтального ряда планшета. Тесты расположены в направлении 1-12; 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 лунки № 5 (с лизином), № 6 (с орнитином), № 7 (с индолом), № 9 (с мочевиной) и по 5 капель из флакона с крышечкой-капельницей в лунки № 2 (с сероводородом).

5. Планшет накрыть крышечкой и поместить его в пакет, завернув край пакета вниз.

6. Инкубировать планшет при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ от 18 до 24 ч.

VIII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Учет результатов проводить визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) после инкубации от 18 до 24 ч. Учет теста на обнаружение β-галактозидазы проводить дважды: через 4 ч и после инкубации от 18 до 24 ч, т.к. у некоторых штаммов лимонно-желтое окрашивание по окончании инкубации бледнеет или совсем исчезает.

По окончании инкубации добавить в лунки № 12 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 № 7 по 0,075 мл (или 1-2 капли из флакона-капельницы) реактив для теста «индол»; в лунки №4 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:		
1	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
2	Образование сероводорода	Желтоватый	Черный, темно-серый	Желтоватый, светло-серый
3	Наличие β-галактозидазы	Бесцветный	Лимонно-желтый	Бесцветный
4	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Зеленый, темно-зеленый	Желтый
5	Наличие лизиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
6	Наличие орнитиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
7	Образование индола	Бесцветный	Розовый	Лимонно-желтый
8	Утилизация малоната натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
9	Наличие уреазы	Желтый	Малиновый, красный	Желтый, оранжевый
10	Утилизация сорбита	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
11	Утилизация инозита	Красный	Желтый	Красный
12	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный, желтоватый	Ярко-розовый, брусничный	Желтоватый, светло-розовый

б) Последующую идентификацию культур микроорганизмов проводить с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий и каталога кодов (прилагаются).

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




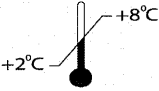


Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат использованию не подлежит.

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 с дифференцирующими субстратами после вскрытия пакета - 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