

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 20__ г.
№ _____

УТВЕРЖДАЮ

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

О.Н.Шлюндия

2010 г.



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

Тест-система для биохимической
идентификации и дифференциации энтеробактерий

Набор № 1

Разработана впервые

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ
«ГИСК им. Л. А. Тарасевича»
Министерства здравоохранения 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, β -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 pH субстрата.	6 шт.
0,85% раствор натрия хлорида pH 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» (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	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 % 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 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 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 распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- При распыливании 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. 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 β -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 pH 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.

ВП.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 крышкой-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 крышкой-капельницей в тест с сероводородом (лунка G синего стрипа).

5. Накрыть планшет крышкой 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 крышкой 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:	
Первый ряд (синий стрип)				
A	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
B	Утилизация малоната натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
C	Гидролиз эскулина	Желтоватый	Черный, темно-коричневый	Желтоватый, светло-коричневый
D	Наличие лизиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
E	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
H	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Зеленый, темно-зеленый	Желтый

Второй ряд (черный стрип)				
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 β -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
Третий ряд (желтый стрип)				
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

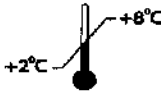
Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат использованию не подлежит.

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/CE 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

ООО ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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

Разработана впервые

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



И. В. Борисевич
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 распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- При распыливании 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	Klebsiella pneumoniae №579	Escherichia coli №1882	Enterobacter cloacae №1903	Proteus vulgaris 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 24 ч.

Стерильной пипеткой отмерить по 2,5 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида pH 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 фенилала- ниндеаминазы	Бесцветный	Зеленый, темно-зеленый	Желтый
5	Наличие лизин- декарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
6	Наличие орнитин- декарбоксилазы	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 ацетил- метилкарбинола	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

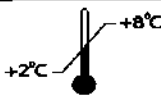
Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат использованию не подлежит.

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.

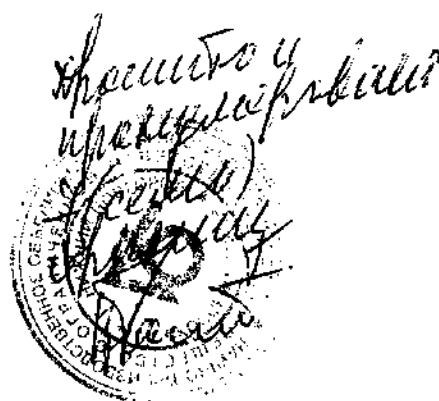
Х.ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE 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



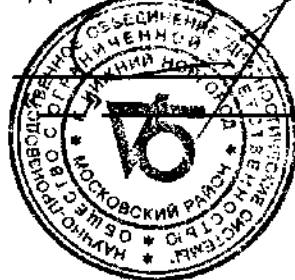


УТВЕРЖДЕНА

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-САЛЬМОНЕЛЛА»

**Тест-система для биохимической идентификации и межвидовой
дифференциации сальмонелл**

Набор № 3

Разработана впервые

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



И. В. Борисевич
2010 г.

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА».....	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	4
VII. Проведение анализа.....	5
VIII. Учет результатов.....	5
IX.. Срок годности. Условия хранения и транспортировки.....	6
X. Объяснение символов.....	6

Набор рассчитан на идентификацию и дифференциацию до вида и подвида по 8-и биохимическим признакам 24 штаммов сальмонелл, выделенных в ходе бактериологического анализа. Возможно дробное 24-х кратное использование набора на протяжении срока его годности.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА» предназначен для определения ферментативной активности микроорганизмов рода *Salmonella*, выделяемых в ходе бактериологического анализа, и идентификация их до вида и подвида. Тест-система позволяет определить следующие биохимические свойства сальмонелл: утилизацию цитрата натрия, малоната натрия, сорбита, дульцита, лактозы; наличие β -галактозидазы, декарбоксилаз орнитина и лизина. Тест-система может быть использована в медицинской и ветеринарной практике.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА»

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Стрипы планшета полистиролового 96-луночного разборного, на дно лунок которых нанесены соответствующие субстратно-индикаторные питательные среды, стабилизированные поливиниловым спиртом. Цвет субстрата в лунке зависит от применяемого индикатора и pH субстрата: лунки А, В, С, D (тесты с цитратом натрия, лизином, орнитином, малонатом натрия) коричнево-желтого цвета, лунки Е (тест на β -галактозидазу) белого цвета, лунки F, G, H (тесты с лактозой, сорбитом, дульцитом) оранжевого цвета.	24 шт. – 6 пакетов
0,85% раствор натрия хлорида pH от 6,7 до 7,2, стерильный. Прозрачная бесцветная жидкость.	40,0 мл – 2 фл.

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

Дополнительно в состав набора входят:

Крышка для планшета стерильная	1 шт.
Полиэтиленовый пакет	2 шт.
Рамка для стрипов	2 шт.
Бланк учета результатов	2 шт.
Таблица биохимических свойств сальмонелл	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, составляющие набор тест-системы не представляют химической опасности (не являются наркотиками, ядами, взрывчатыми веществами и ЛВЖ).

• Работы в лаборатории, связанные с идентификацией сальмонелл, 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 стрипы планшета обезвреживать автоклавированием в паровом стерилизаторе в течение часа при температуре от 124 до 128 °C 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 протереть 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 распыливания образцов или растворов, содержащих образцы.
- При распыливании 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 $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- 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) на 5 единиц 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 штаммов представлена в таблице 2

Таблица 2

Характеристика контрольных штаммов

№	Тесты	<i>Escherichia coli</i> №1882	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №579	<i>Proteus vulgaris</i> HX19 №222	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i> 735-60/210
1	Утилизация цитрата натрия	-	+	±	+
2	Наличие лизиндекарбоксилазы	+	+	-	+
3	Наличие орнитидекарбоксилазы	+	-	-	+
4	Утилизация малоната натрия	-	+	-	+
5	Наличие β-галактозидазы	+	+	-	+
6	Утилизация лактозы	+	+	-	+зам*
7	Утилизация сорбита	+	+	-	-
8	Утилизация дульцита	-	+	-	-
9	Образование сероводорода	-	-	+	+
10	Образование газа из глюкозы	+	+	-	+

зам*- замедленно (от 36 до 42 часов инкубации)

VI. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.

Исследование проводить с чистой культурой, после определения принадлежности к семейству Enterobacteriaceae (грамотрицательные, оксидазаотрицательные палочки, утилизирующие глюкозу в аэробных и анаэробных условиях по тесту Хью-Лейфсона, подвижные и неподвижные), подозрительные на сальмонеллы по характеру роста на трехсахарном агаре типа Олькеницкого.

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, производят предварительный посев ее в питательный бульон на 2-4 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, затем осуществляют пересев

культуры на поверхность питательного агара и инкубируют от 18 до 24 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Стерильной пипеткой отмерить по 2,0 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида pH 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 минут.

VII. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

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

2. Вынуть из пакета необходимое количество стрипов и поместить их в рамку (цветная маркировка на ярлычке стрипа – к лунке Н). Для удобства в работе и исключения ошибок при внесении микробной суспензии стрипы можно раздвинуть.

3. Внести стерильно пипеткой по 0,1 мл микробной суспензии в лунки одного вертикального ряда (стрипа). Тесты расположены в вертикальном направлении, один стрип – один анализ; возможно применение автоматического пипеточного дозатора с использованием наконечников с защитными фильтрами.

4. Рамку со стрипами накрыть крышкой и поместить в пакет, завернув край пакета вниз.

5. Планшет инкубировать при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение от 16 до 24 ч.

VIII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Учет результатов проводить визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) через 16-24 ч инкубации (учет теста на обнаружение β -галактозидазы возможно проводить через 2 - 4 ч).

Значение тестов 9 (образование сероводорода) и 10 (образование газа из глюкозы) следует взять со среды Олькеницкого или аналогичного трехсахарного агара.

Таблица 3

Цветовой указатель				
Название теста		Цвет растворенного субстрата	Критерии оценки	
			Положительный результат	Отрицательный результат
			Смена окраски субстрата на:	
A	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий, голубой	Желтый, светло-зеленый
B	Наличие лизиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий, голубой	Желтый, светло-зеленый
C	Наличие орнитиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий, голубой	Желтый, светло-зеленый
D	Утилизация малоната натрия	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий, голубой	Желтый, светло-зеленый
E	Наличие β -галактозидазы	Бесцветный	Лимонно-желтый	Бесцветный
F	Утилизация лактозы	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
G	Утилизация сорбита	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
H	Утилизация дульцита	Красный	Желтый	Красный

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

Возможна автоматизированная процедура идентификации микроорганизмов рода *Salmonella* с использованием «Программного обеспечения для автоматизированной идентификации бактерий»

производства ООО «НПО «Диагностические системы», которое позволяет идентифицировать сальмонеллы как методом кодов (при типичном поведении штаммов), так и методом расстояний на основе кластерного анализа (при атипичном поведении штаммов). «Программное обеспечение» в состав набора не входит.

Для определения сероварианта сальмонелл необходимо провести серотипирование с агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками в реакции агглютинации на стекле.

IX. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

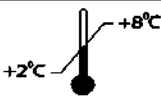
Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат ^{набор} использованию не подлежит.

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, стрипы 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. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

X. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE 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

Министр
Здравоохранения
Республики Беларусь

