

**УТВЕРЖДЕНА**

Приказом Росздравнадзора

от \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

№ \_\_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

Заместитель генерального директора

ООО «Научно-производственное

объединение «Диагностические системы»



О.Н. Шлюндин

2011 г.

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**по применению набора реагентов**  
**«ДС-ДИФ-НЕФЕРМ»**

**Тест-система для биохимической идентификации**  
**и дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий**

**Разработана впервые**

## Содержание

|                                                                                |   |
|--------------------------------------------------------------------------------|---|
| Назначение.....                                                                | 3 |
| Состав набора «ДС-ДИФ-НЕФЕРМ».....                                             | 3 |
| Аналитические и диагностические характеристики теста .....                     | 3 |
| Меры предосторожности .....                                                    | 4 |
| Инструкции по безопасности.....                                                | 4 |
| Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов..... | 4 |
| II. Отбор и подготовка образцов .....                                          | 5 |
| III. Подготовка реагентов.....                                                 | 6 |
| IV. Проведение анализа.....                                                    | 6 |
| Учет результатов.....                                                          | 7 |
| V. Срок годности. Условия хранения и транспортировки.....                      | 8 |
| VI. Объяснение символов.....                                                   | 8 |

Набор рассчитан на идентификацию и дифференциацию до вида по 24-м биохимическим признакам 24 штаммов микроорганизмов группы грамотрицательных неферментирующих бактерий, выделенных в ходе бактериологического анализа.  
 Возможно дробное 24-ти кратное использование набора на протяжении срока его годности.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ДС-ДИФ-НЕФЕРМ предназначен для фенотипической идентификации микроорганизмов группы грамотрицательных неферментирующих бактерий (НФБ), выделяемых в ходе бактериологического анализа, в течение 48 часов. Тест-система позволяет определить следующие биохимические свойства НФБ: утилизация цитрата натрия, сахарозы, инозита, глюкозы, галактозы, целлобиозы, ксилозы, маннита, трегалозы, мальтозы, лактозы, наличие уреазы, β-галактозидазы, β-глюкозидазы, γ-глутамилтрансферазы, N-ацетил-β-D-галактозаминидазы, щелочной фосфатазы, декарбоксилазы лизина, дигидролазы аргинина, глутаредуктазы, нитритредуктазы, гидролиз эскулина, образование индола.  
 Тест-система может быть использована в медицинской и ветеринарной практике.

### СОСТАВ НАБОРА «ДС-ДИФ-НЕФЕРМ»

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.           |
| 0,5% раствор натрия хлорида pH от 6,9 до 7,4, стерильный.<br>Прозрачная бесцветная жидкость.                                                                                                                                                               | 40,0 мл - 3 фл. |
| Масло вазелиновое, стерильное.<br>Прозрачная вязкая жидкость с желтоватым оттенком.                                                                                                                                                                        | 9,0 мл - 1 фл.  |
| Реактив для теста «индол» (пара-диметиламинобензальдегида раствор 3,5%).<br>Прозрачная светло – желтого цвета жидкость.                                                                                                                                    | 4,5 мл - 1 фл.  |
| Реактив для тестов «нитраты» и «нитриты» (реактив Грисса раствор 10%).<br>Бесцветная или светло-серого цвета жидкость. В процессе хранения возможно образование осадка, который растворяется при встряхивании.                                             | 3,0 мл – 1 фл.  |

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

Дополнительно в состав набора входят:

|                                                     |        |
|-----------------------------------------------------|--------|
| Лопатка-капельница для флакона с вазелиновым маслом | 1 шт.  |
| Флаконы-капельницы для дополнительных реагентов     | 2 шт.  |
| Лопатка для планшета стерильная                     | 1 шт.  |
| Пакет полиэтиленовый                                | 6 шт.  |
| Бланк учета результатов                             | 6 шт.  |
| Таблица биохимических свойств НФБ                   | 1 шт.  |
| Модовая карточка                                    | 24 шт. |

### АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Оценка диагностической чувствительности и специфичности тест-системы проводилась на контрольных штаммах и клинических образцах в сравнении с референс тест-системой. Чувствительность теста составила - 99%, специфичность – 100%.

## 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 пикриновую кислоту, которые являются ЛВЖ, ядовитыми и едкими веществами. При работе необходимо соблюдать правила личной гигиены и меры предосторожности: работать в одноразовых перчатках, не пипетировать ртом, работу с реактивами проводить вдали от открытого огня.
- Работы в лаборатории, связанные с идентификацией бактерий 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 стерилизаторе в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 атм (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 дезинфектанта. Крышку для планшета 2 раза протереть 70 % этиловым спиртом. После обезвреживания раствором рамку планшета и крышку можно использовать повторно. Микродозаторы до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

## 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.

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

- Термостат, поддерживающий температуру  $(30,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ;
- пипетки стерильные стеклянные концевые калиброванные 2 класса точности на 1 мл и 5 мл
- 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 42-28-86-01 (СМЕ) или 2 степени по шкале MacFarland;
- спиртовка, бактериологические петли.
- При необходимости проведения проверки функциональности набора следует использовать стерильные штаммы из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Характеристика свойств контрольных штаммов представлена в таблице 2.

Таблица 2.

## Характеристика контрольных штаммов

| тесты                                    | <i>Klebsiella oxytoca</i> №82 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> №1960 CCM | <i>Burkholderia cepacia</i> №8238 | <i>Alcaligenes faecalis</i> № 373 | «отриц» контр. 0,85% р-р натрия хлорида рН от 6,9 до 7,4 |
|------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| гидролиз сахарозы                        | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз инозита                         | +                             | -                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз фруктозы                        | +                             | ±                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз глюкозы                         | +                             | +                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие оксидокислороксилазы             | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие уреазы                           | +                             | +                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие индигидролазы                    | -                             | +                                       | -                                 | -                                 | -                                                        |
| образование индола                       | +                             | -                                       | -                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз галактозы                       | +                             | +                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз целлобиозы                      | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз ксилозы                         | +                             | +                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз маннита                         | +                             | ±                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие N-ацетил-D-глюкозаминидазы (NAG) | -                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие β-глюкозидазы                    | с                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие галактозидазы                    | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие фосфатазы                        | +                             | с                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз цитрата                         | +                             | +                                       | +                                 | +                                 | -                                                        |
| гидролиз трегалозы                       | +                             | -                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз мальтозы                        | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз лактозы                         | +                             | -                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие α-галактилтрансферазы            | +                             | +                                       | +                                 | -                                 | -                                                        |
| гидролиз эскулина                        | +                             | -                                       | с                                 | -                                 | -                                                        |
| наличие α-глюкуронидазы                  | -                             | +                                       | -                                 | +                                 | -                                                        |
| наличие α-глюкуронидазы                  | +                             | +                                       | -                                 | -                                 | -                                                        |

## ОБОДОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Исследование проводить с чистой культурой, после определения принадлежности к группе (грамотрицательные, оксидазоположительные, редко оксидазоотрицательные палочки или кокки, утилизирующие или не утилизирующие глюкозу в аэробных условиях по тесту Лейфсона, подвижные и неподвижные).

Для работы использовать культуры, выращенные от 18 до 24 ч при температуре  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  на поверхности питательного агара: СПА, МПА, ГРМА, Мартеновский или Хоттингера (можно с добавлением 5 % крови и/или 5% глицерина). Если культура микроорганизма находилась какое-то время на хранении при комнатной температуре или в холодильнике, произвести предварительный посев ее в питательный бульон на 18-24 ч при температуре  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , затем пересев культуры на поверхность питательного агара и инкубировать от 18 до 24ч.

Стерильной пипеткой отмерить по 4,5 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида рН от 6,9 до 7,4 из флакона в стерильные пробирки (по количеству исследуемых культур). Из суточной 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 методу мутности бактериальных взвесей, стеклянному, или второй степени по шкале McFarland. Готовленную микробную суспензию до начала исследования хранить не более 30 мин.

## II. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

**Разборные 96-луночные планшеты с субстратно-индикаторными питательными средами.** Готовы к использованию. Хранить в пакетах, тщательно закрытых на замок Zip-Lock, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшиеся неиспользованными планшеты или стрипы с дифференцирующими субстратами хранить в пакете, тщательно закрытом на замок Zip-Lock, в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

**0,85 % раствор натрия хлорида рН от 6,9 до 7,4, стерильный.** Готов к использованию. Хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся использованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

**Реактив для теста «индол».** Готов к использованию. Хранить во флаконах или флаконах-капельницах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся использованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

**Реактив для тестов «нитраты» и «нитриты».** Готов к использованию. Хранить во флаконах или флаконах-капельницах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся использованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

**Масло вазелиновое, стерильное.** Готово к использованию. Хранить во флаконах, закрытых винтовыми пробками или крышками-капельницами, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся использованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

## III. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Вскрыть пакет с маркировкой «первый ряд (синий стрип)» по линии запайки со стороны надреза. Вынуть из пакета планшет, оставить в рамке необходимое количество стрипов (по количеству исследуемых культур). Стрипы с питательными субстратами, не используемые для микробной постановки, вынуть из рамки и поместить в пакет, закрыв пакет на замок. Аналогично вскрыть пакеты с маркировкой «второй ряд (желтый стрип)», «третий ряд (черный 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, желтый, черный). 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 0,15 мл микробной суспензии одной культуры в лунки 3-х стрипов (синий, желтый, черный). Тесты расположены в направлении А-Н (три стрипа – один планшет), возможно применение автоматического пипеточного дозатора с использованием одноразовых пипеточников с защитными фильтрами.

4. Для создания анаэробных условий добавить стерильное вазелиновое масло по 3 капли из флакона с крышкой-капельницей в тесты с лизином, мочевиной, аргинином, индолом (лунки Е, Ф, Г и Н синего стрипа).

5. Накрыть планшет крышкой и поместить его в полиэтиленовый пакет, завернув при этом пакет в пакет.

6. Планшет инкубировать при температуре  $(30,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  до 48 часов.

## IV. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Учет результатов проводить визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) после инкубации до 48 часов.

По окончании инкубации добавить в лунки Н первого ряда по 0,1 мл (или 2 капли из флакона-капельницы) реактив для теста «индол». Планшет накрыть крышкой и инкубировать 15 минут при комнатной температуре. Затем внести в лунки Г и Н третьего ряда по 0,05 мл (или 1

...лю из флакона-капельницы) реактив для тестов «нитраты» и «нитриты». Результат  
...тывать через 1-2 минуты по критериям цветового указателя (таблица 3).

Таблица 3

Цветовой указатель

| Название теста                                 | Цвет растворенного субстрата     | Критерии оценки                  |                                  |
|------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                                |                                  | Положительный результат          | Отрицательный результат          |
|                                                |                                  | Смена окраски субстрата на:      |                                  |
| Первый ряд (синий стрип)                       |                                  |                                  |                                  |
| Утилизация сахарозы                            | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация инозита                             | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация фруктозы                            | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация глюкозы                             | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Наличие<br>α-глицеролфосфаткиназы              | Зеленый                          | Синий                            | Зеленый                          |
| Наличие уреазы                                 | Желтый                           | Красный, малиновый               | Желтый, оранжевый                |
| Наличие<br>α-аминогидролазы                    | Желтый,<br>светло-зеленый        | Синий                            | Желтый,<br>зеленый               |
| Образование индола                             | Бесцветный                       | Розовый                          | Желтый                           |
| Второй ряд (желтый стрип)                      |                                  |                                  |                                  |
| Утилизация галактозы                           | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация целлобиозы                          | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация ксилозы                             | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация маннита                             | Красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Наличие N-ацетил-β-D-<br>глюкозаминидазы (NAG) | Бесцветный,<br>бледно-желтый     | Лимонно-желтый                   | Бесцветный,<br>бледно-желтый     |
| Наличие β-глюкозидазы                          | Бесцветный                       | Бледно-желтый,<br>Лимонно-желтый | Бесцветный                       |
| Наличие β-галактозидазы                        | Бесцветный                       | Бледно-желтый,<br>Лимонно-желтый | Бесцветный                       |
| Наличие фосфатазы                              | Бесцветный,<br>бледно-желтый     | Лимонно-желтый                   | Бесцветный,<br>бледно-желтый     |
| Третий ряд (черный стрип)                      |                                  |                                  |                                  |
| Утилизация цитрата<br>натрия                   | Желтый,<br>светло-зеленый        | Темно-зеленый,<br>синий          | Желтый,<br>светло-зеленый        |
| Утилизация трегалозы                           | красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация мальтозы                            | красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Утилизация лактозы                             | красный                          | Желтый, оранжевый                | Красный                          |
| Наличие γ-глутамил-<br>трансферазы             | Бесцветный                       | Лимонно-желтый                   | Бесцветный,<br>бледно-желтый     |
| Гидролиз эскулина                              | Желтоватый,<br>светло-коричневый | Черный,<br>темно-коричневый      | Желтоватый,<br>светло-коричневый |
| Наличие<br>α-аминогидролазы                    | Бесцветный                       | Бесцветный,<br>светло-розовый    | Темно-красный                    |
| Наличие<br>α-аминогидролазы                    | Бесцветный                       | Темно-красный                    | Бесцветный,<br>светло-розовый    |

Последующую идентификацию культур микроорганизмов проводить с использованием  
...и биохимических свойств НФБ (прилагается к набору) и каталога кодов.

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

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

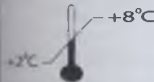
Срок годности набора - 12 месяцев. После истечения срока годности препарат к использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Размораживание 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.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или (831) 434-97-12.

E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

## ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

|                                                                                     |                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|    | ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ) |
|    | Только для лабораторного использования                                        |
|    | Производитель                                                                 |
|  | Код партии (номер серии)                                                      |
|  | Каталожный номер                                                              |
|  | Количество определений                                                        |
|  | Температурные пределы хранения                                                |
|  | Срок годности дата/месяц/год                                                  |
|  | Используйте инструкцию по применению                                          |

Директор по производству, к.б.н

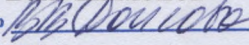
ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»  
д.м.н, профессор



В.К. Нименов

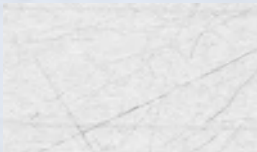
Подпись   
удостоверяю:

Специалист по кадрам РМАПО

Подпись

“26” 09 2014 года

В.В. Долгов



|         |  |
|---------|--|
| Подпись |  |
| Место   |  |
| Дата    |  |



Испыт  
ГОУ.

Докум  
облас  
надзо  
и соци

Наим  
бных  
нефер

Изгото  
Росси  
тел.: (8

Цель  
нормат  
99, ГС  
здорово  
технич

Протоко