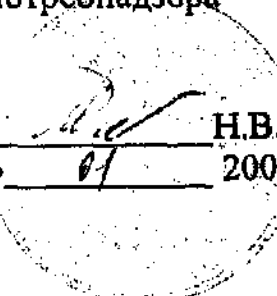


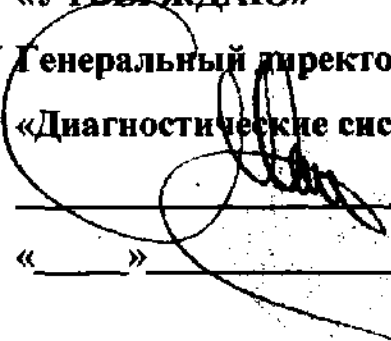
«СОГЛАСОВАНО»
Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора



Н.В. Медуницын
«26» 01 2004

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «НПО
«Диагностические системы»



И. Е. Колосов
«___» _____ 200 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ)»

Состав набора:

ПБДЭ – пластина с 20 конусообразными лунками, содержащими сухие питательные субстраты с индикаторами. Позволяет определить следующие биохимические свойства культур энтеробактерий: утилизацию цитрата натрия, как в присутствии сахара (модификация цитратной среды Христенсена), так и без него (модификация цитратной среды Симмонса), малоната натрия, глюкозы, лактозы, маннита, сахарозы, инозита, сорбита, арабинозы, мальтозы, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра), наличие уреазы, β -галактозидазы, декарбоксилаз орнитина и лизина, дегидролазы аргинина, дезаминазы фенилаланина.

Дополнительные реагенты для учета результатов анализа:

железа (III) хлорид гексагидрат,

пара-диметиламинобензальдегид,

α -нафтол,

калия гидроксид,

фосфатно-солевой буферный раствор, сухой - ФБР - натрия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, натрия хлорид,

масло вазелиновое.

Взамен инструкции, утвержденной 22.05.2003 г.

Набор рассчитан на дифференциацию до вида 20 культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в ходе бактериологического анализа.

Описание

Пластина с 20 конусообразными лунками (пронумерованными слева направо, начиная с верхнего ряда), содержащими сухие питательные субстраты с индикаторами, стабилизированные поливиниловым спиртом. Цвет среды в лунке зависит от применяемого индикатора и pH субстрата (см. таблицу № 1, графа 3). Пластина закрывается крышкой.

Дополнительные реагенты:

железа (III) хлорид гексагидрат - кристаллическая масса желто-бурого цвета,

α -нафтол – кристаллическая масса розоватого цвета,

пара-диметиламинобензальдегид – кристаллический порошок серого или светло-желтого цвета, допускается зеленоватый оттенок,

калия гидроксид – белые кристаллы неправильной формы,

фосфатно-солевой буферный раствор, сухой (ФБР) – кристаллическая масса белого цвета,

вазелиновое масло – прозрачная вязкая жидкость с желтоватым оттенком.

Назначение

Определение ферментативной активности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в ходе бактериологического анализа, и дифференциация их до вида.

Способ применения:

1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки анализа.

1. Термостат;

2. Дозаторы пипеточные переменного объема (одно- и многоканальные) с одноразовыми наконечниками с погрешностью измерения не более 5%;

3. Стерильный фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH от 6,0 до 6,2;
4. Пипетки стеклянные вместимостью 1 мл 2 класса точности по ГОСТ 20292-76 Е;
5. Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности) (ОСО 42-28-85-06П) – 10 МЕ;
6. Пробирки стеклянные стерильные.

2. Приготовление растворов дополнительных реагентов

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH от 6,0 до 6,2 – для приготовления суспензии исследуемых образцов культур микроорганизмов. Содержимое флакона с сухими компонентами ФБР растворить в 100,0 мл дистиллированной воды. Стерилизовать автоклавированием при температуре 120 °С при давлении 1,1 атм в течение 30 мин, концентрацию водородных ионов (pH) контролировать на иономере универсальном до и после стерилизации.

Железа (III) хлорид гексагидрат – для выявления наличия фенилаланиндезаминазы. Для приготовления 10 % раствора содержимое флакона растворить в 1,8 мл дистиллированной воды.

Пара-диметиламинобензальдегид – для обнаружения индолообразования. Для приготовления реактива Эрлиха навеску растворить в 1,9 мл 96 % этилового спирта, а затем добавить 0,4 мл 33 % раствора хлористоводородной кислоты.

α-нафтол – для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Для получения 6 % раствора содержимое флакона растворить в 2,38 мл 96 % этилового спирта. Готовят «ex tempore».

Калия гидроксид – для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Для получения 40 % раствора содержимое флакона растворить в 1,2 мл дистиллированной воды.

Масло вазелиновое стерильное – для создания анаэробных условий при определении наличия лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, уреазы и образования сероводорода. Готово к применению.

3. Подготовка исследуемых образцов

Для идентификации культуры энтеробактерий выращивают на питательном агаре или на средах для первичной дифференциации (среда Клиглера, Олькеницкого и др.) в течение 18-24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Если выделенная культура до идентификации хранилась при температуре $4-8^\circ\text{C}$, производят ее предварительный посев на питательный бульон. После инкубации в течение 5-7 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ производят пересев культуры на скошенный питательный агар. Через 18-24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ производят повторный пересев в пробирки со скошенным питательным агаром и культивируют 18-24 ч. Для идентификации готовят микробную суспензию в фосфатно-солевом буферном растворе (рН от 6,0 до 6,2) густотой 10 единиц по отраслевому стандартному образцу для визуального определения мутности бактериальных взвесей. При отсутствии стандартного образца 2-3 петли культуры вносят в пробирки с 4,0 мл фосфатно-солевого буферного раствора.

4. Ход анализа

4.1. Извлекают пластину из полиэтиленового пакета.

4.2. Регистрируют на крышке пластины номер засеваемого штамма.

4.3. Открывают крышку пластины и располагают пластину на столе.

4.4. Добавляют пипеткой вместимостью 1,0 мл по 0,15 мл микробной суспензии во все лунки пластины.

4.5. Для создания анаэробных условий наслаивают по 1 - 2 капли стерильного вазелинового масла в лунки для определения лизиндекарбоксилазы (№ 4), аргининдегидролазы (№ 5), орнитиндекарбоксилазы (№ 6), уреазы (№ 10) и образования сероводорода (№ 11).

4.6. Закрывают пластину крышкой.

4.7. Выдерживают пластину при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ от 18 до 24 ч.

Учёт результатов

Учёт результатов производят визуально в соответствии с цветовым указателем (см. таблицу № 1) по окончании инкубации при температуре

($37 \pm 0,5$) °C. Учет результатов теста на обнаружение β -галактозидазы проводят дважды: через 3 - 5 ч и через 18 - 24 ч, так как у некоторых штаммов лимонно-жёлтое окрашивание через 18 - 24 ч исчезает.

После окончания инкубации открывают крышку пластины и в лунку для выявления фенилаланиндезаминазы (№ 7) добавляют 1 каплю 10 % раствора железа (III) хлорида, в лунку для определения ацетилметилкарбинола (№ 9) – 1 каплю 6 % раствора α -нафтола и 1 каплю 40 % раствора гидроксида калия, в лунку для выявления индола (№ 8) – 1 - 3 капли реактива Эрлиха. Выявление ацетилметилкарбинола (№ 9) осуществляют через 15 - 20 мин после закапывания реактивов.

Идентификацию культур микроорганизмов проводят с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий, диагностического “ключа”, кодовой карточки, каталога кодов – пособия для интерпретации результатов идентификации с использованием математического метода классификации.

Таблица № 1

Цветовой указатель

№ лунки и теста	Наименование теста	Цвет среды в сухом виде	Цвет среды в растворённом виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	2	3	4	5	6
1.	Утилизация цитрата натрия	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
2.	Утилизация малоната натрия	Жёлтый	Жёлтый	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
3.	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	Жёлтый, коричневый	Жёлтый, коричневый	Фиолетовый, бурый	Жёлтый, коричневый
4.	Наличие лизиндекарбоксилазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
5.	Наличие аргининдегидролазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
6.	Утилизация орнитиндекарбоксилазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
7.	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Бесцветный	Тёмно-зелёный	Жёлтый
8.	Образование индола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый	Бесцветный

9.	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый, малиновый	Бесцветный
10.	Наличие уреазы	Жёлтый	Жёлтый	Малиновый, красный	Жёлтый
11.	Образование сероводорода	Бесцветный	Бесцветный	Черный, темно-серый, коричневый	Жёлтый
12.	Утилизация глюкозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
13.	Наличие β -галактозидазы	Бесцветный	Бесцветный	Жёлтый	Бесцветный
14.	Утилизация лактозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
15.	Утилизация маннита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
16.	Утилизация сахарозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
17.	Утилизация инозита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
18.	Утилизация сорбита	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
19.	Утилизация арабинозы	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
20.	Утилизация мальтозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный

Обеззараживание Использованную пластину обеззараживают погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) или в 3 % раствор хлорамина Б или другого разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации не менее 1 ч.

Форма выпуска

Выпускается в виде набора реагентов:

Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии

– 20 штук в запаянном полиэтиленовом пакете 1 пакет

Масло вазелиновое – 8,0 мл 1 фл

Железа (III) хлорид гексагидрат – 0,2 г 1 фл

Пара-диметиламинобензальдегид – 0,05 г 1 фл

α -нафтол – 0,12 г 1 фл

Калия гидроксид – 0,8 г 1 фл

Фосфатно-солевой буферный раствор, сухой (рН от 6,0 до 6,2) 1 фл

– на 0,100 л раствора (натрия гидрофосфат – 0,03 г, калия дигидрофосфат – 0,07 г, натрия хлорид – 0,85 г).

Пластины в полиэтиленовом пакете, дополнительные реагенты, диагностический «ключ», таблица биохимических свойств энтеробактерий, кодовые карточки и инструкция по применению упакованы в коробку картонную.

По заявке потребителей к ПБДЭ может быть приложен каталог кодов.

Срок годности. Условия транспортирования и хранения.

Срок годности набора - 12 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 25 °С. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 25 °С в течение всего срока годности.

Условия отпуска - Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора по адресу 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел.: (495) 241-39-22, факс: (495) 241-92-38 и в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, 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.

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



В. К. Пименов