

«УТВЕРЖДАЮ»

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



О.Н.Шлюдин

2012 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«ДС-ДИФ-СТАФИ-16»**

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

Разработана впервые

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Состав набора «ДС-ДИФ-СТАФИ-16».....	3
III. Аналитические и диагностические характеристики теста.....	4
IV. Меры предосторожности.....	4
V. Инструкции по безопасности.....	4
VI. Необходимые материалы и оборудование, не предоставляемые с набором реагентов.	4
VII. Отбор и подготовка образцов.....	5
VIII. Подготовка реагентов.....	5
IX. Проведение анализа.....	6
X. Учет результатов.....	7
XI. Срок годности. Условия хранения и транспортировки.....	8
XII. Объяснение символов.....	9

Набор рассчитан на идентификацию и дифференциацию до вида по 16-и биохимическим признакам 30 штаммов микроорганизмов рода *Staphylococcus*, выделенных в ходе бактериологического анализа.

Возможно дробное 30-ти кратное использование набора на протяжении срока его годности

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ДС-ДИФ-СТАФИ-16 предназначен для фенотипической идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus*, выделяемых в ходе бактериологического анализа, в течение 24 часов. Тест-система позволяет определить следующие биохимические свойства стафилококков: утилизацию маннита, сахарозы, трегалозы, лактозы, мальтозы, маннозы, арабинозы, ксилозы, рибозы, целлобиозы, образование ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), наличие уреазы, β -глюкозидазы, фосфатазы, нитратредуктазы, аргининдигидролазы и дополнительно реакцию плазмокоагулазы (РПК) и резистентность к новобиоцину.

Тест-система может быть использована в медицинской и ветеринарной практике.

II. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ДИФ-СТАФИ-16»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Планшеты полистироловые 96-луночные разборные, на дно лунок которых нанесены сухие субстратно-индикаторные питательные среды. Цвет субстрата в лунке зависит от применяемого индикатора и pH субстрата.	5 шт.
Диски с новобиоцином. Бумажные диски диаметром 0,6 см белого или светло-желтого цвета.	1 фл. 35 дисков
Плазма цитратная кроличья сухая – пористая масса бело-розового цвета в виде таблетки в ампуле или флаконе.	1,0 мл – 2 амп. или 2 фл.
Вода пептонная 1% pH от 7,2 до 7,4 стерильная. Прозрачная светло – желтого цвета жидкость.	40,0 мл - 3 фл.
Масло вазелиновое, стерильное. Прозрачная вязкая жидкость с желтоватым оттенком.	4,0 мл - 1 фл.
Реактив для теста «нитраты» (реактив Грисса раствор 10%). Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная или светло-серого цвета, возможно выпадение осадка, который растворяется при встряхивании.	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.
Раствор натрия хлорида 2,5% - для приготовления рабочего раствора фуксина. Стерильная прозрачная бесцветная жидкость.	40 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.
Флакон-капельница	4 шт.
Планшет для постановки РПК	1 шт.
Крышка для планшета стерильная	2 шт.
Полиэтиленовый пакет	6 шт.
Бланк учета результатов	5 шт.
Таблица биохимических свойств стафилококков	1 шт.
Дифференциальный «ключ»	1 шт.
Кодовые карточки	30 шт.

III. 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 – 95,3%, специфичность – 100%.

IV. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

• Набор тест-системы не содержит в своем составе каких-либо опасных биологических агентов. Компоненты тест-системы: реактив для теста «нитраты» (содержит 10% реактив Грисса – смесь 1-нафтиламина, сульфаниловой и винной кислот), 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 стафилококков 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, использованные планшеты, чашки с посевами 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. Допустимо применение другого разрешенного к использованию дезинфицирующего средства. Крышку для планшета 2 раза протереть 70 % этиловым спиртом. После обезвреживания дезинфицирующим раствором рамку планшета и крышку можно использовать повторно. Микродозаторы до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.

V. 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.

VI. 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;
- Стерильный 0,85% раствор натрия хлорида;
- Отраслевой стандартный образец мутности бактериальной взвеси стеклянный ОСО 42-28-86-06 П (5МЕ) или 2 степени по шкале MacFarland;
- Спиртовка, бактериологические петли, пинцет;
- Чашки Петри с агаром для определения чувствительности к антибиотикам (АГВ или Мюллера-Хинтона);
- Концентрированный раствор фуксина (используемый для окраски мазков по Граму);
- 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.

Характеристика контрольных штаммов

№	тесты	<i>S.aureus</i> № 28	<i>S.epidermidis</i> № 592	<i>S.cohnii</i> <i>ssp.cohnii</i> № 6	<i>S.gallinarum</i> № 3572	<i>M.luteus</i> № 2
Первый ряд						
A	Утилизация маннита	+	-	+	+	-
B	Утилизация сахарозы	+	+	-	+	-
C	Утилизация трегалозы	+	-	+	+	-
D	Утилизация лактозы	+	+	-	+	-
E	Утилизация мальтозы	+	+	+	+	-
F	Утилизация маннозы	+	+	±	+	-
G	Утилизация арабинозы	-	-	-	+	-
H	Утилизация ксилозы	-	-	-	+	-
Второй ряд						
A	Утилизация рибозы	-	±	+	±	-
B	Утилизация целлобиозы	-	-	-	+	-
C	Наличие β-глюкозидазы	+	±	-	±	-
D	Наличие фосфатазы	+	+	-	+	-
E	Наличие аргининдигидролазы	+	+	-	-	-
F	Наличие уреазы	+	+	-	+	+
G	Наличие нитратредуктазы	+	+	-	+	-
H	Образование ацетилметилкарбинола	+	+	-	-	-
17	Наличие РПК	+	-	-	-	-
18	Резистентность к новобиоцину	-	-	+	+	-

VII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Исследование проводить с чистой культурой, после определения принадлежности к роду *Staphylococcus* (грамположительные, каталазоположительные кокки, образующие или не образующие лецитовителлазу на желточно-солевом агаре, растущие с гемолизом или без него на кровяном агаре).

Для работы использовать культуры, выращенные от 18 до 24 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ на поверхности питательного агара: ЖСА, МСА или 5% Кра (на основе СПА, МПА, ГРМА или Хоттингера). Если культура микроорганизма находилась какое-либо время на хранении при комнатной температуре или в холодильнике, предварительно подрастить ее в питательном бульоне в течение 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 при той же температуре.

Стерильной пипеткой отмерить по 3,0 мл стерильной 1% пептонной воды pH от 7,2 до 7,4 из флакона в стерильные пробирки (по количеству исследуемых культур). Из суточной агаровой культуры приготовить суспензию в 1% пептонной воде, подогретой до температуры 30-35 °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; использовать для определения биохимических свойств микроорганизма, определения РПК, приготовления рабочей суспензии для определения резистентности к новобиоцину.

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Планшеты полистироловые 96-луночные разборные 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 °C. В

случае дробного использования набора, оставшиеся неиспользованными планшеты или стрипы с дифференцирующими субстратами хранить в пакете, тщательно закрытом на замок Zip-Lock, при температуре от 2 до 8 °С до конца срока годности.

Вода пептонная 1%, рН от 7,2 до 7,4, стерильная. Готова 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 неиспользованным реагент хранить при температуре от 2 до 8 °С до конца срока годности.

Масло вазелиновое, стерильное. Готово к использованию. Хранить во флаконе, закрытом резиновой пробкой или крышкой-капельницей, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся неиспользованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Реактив для теста «нитраты». Готов к использованию. Хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой, или флаконе-капельнице на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся неиспользованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Реактив 1 для теста «АМК». Готов к использованию. Хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой или флаконе-капельнице, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся неиспользованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Реактив 2 для теста «АМК». Готов к использованию. Хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой или флаконе-капельнице, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. В случае дробного использования набора, оставшийся неиспользованным реагент хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С.

Плазма цитратная кроличья сухая. Хранить на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. Содержимое ампулы с плазмой кроличьей цитратной сухой растворить в 1 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида, затем разбавить еще тем же раствором (1,0 мл + 2,3 мл). Разведенную плазму хранить при температуре от 2 до 8 °С не более двух недель.

Раствор натрия хлорида 2,5%. Хранить во флаконе, закрытом винтовой крышкой на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. Для приготовления рабочего солевого раствора фуксина необходимо концентрат фуксина разбавить 2,5% раствором натрия хлорида 1:10. Рабочий солевой раствор фуксина хранить не более двух недель при температуре от 2 до 8 °С.

Диски с новобиоцином. Готовы к использованию. Хранить во флаконе с осушителем, закрытом резиновой пробкой, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8 °С. Вату из флакона не удалять. Перед работой с дисками флакон выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин.

IX. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Определение биохимических свойств.

1.1. Вскрыть пакет 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 в данной постановке, вынуть из рамки и поместить в пакет для хранения, пакет закрыть на замок. Для удобства в работе и исключения ошибок при внесении микробной суспензии стрипы можно плотно не сдвигать.

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

1.3. Внести стерильно пипеткой по 0,1 мл микробной суспензии одной культуры в лунки одного двухрядного стрипа, возможно применение автоматического пипеточного дозатора с использованием наконечников с защитными фильтрами.

1.4. Для создания анаэробных условий добавить по 3 капли стерильного вазелинового масла из флакона с крышкой-капельницей в тесты с аргинином и мочевиной (лунки Е, F второго ряда).

1.5. Накрыть планшет крышкой и поместить его в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или завернуть край пакета под планшет.

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

2. Определение реакции плазмокоагуляции (РПК) микрометодом.

2.1. Взять вспомогательный планшет, оставив в нем необходимое количество лунок (не более 2-х лунок на одну культуру), остальные стрипы вынуть из рамки и поместить в пакет, пакет закрыть на замок.

2.2. Внести стерильной пипеткой по 0,1 мл разведенной кроличьей плазмы в лунки вспомогательного планшета.

2.3. Внести по 0,05 мл микробной суспензии в лунки с плазмой.

2.4. Накрыть планшет крышкой и поместить его в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или завернуть край пакета под планшет.

2.5. Планшет инкубировать при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ от 4 до 24 часов.

3. Определение резистентности к новобиоцину диско-диффузионным методом (ДДМ).

3.1. Для одной культуры необходимо иметь одну чашку Петри с агаром для определения чувствительности к антибиотикам. Чашку с агаром подсушить в термостате до исчезновения конденсата на крышке, поместив вверх дном чашку и крышку при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

3.2. В стерильную пробирку внести 2,3 мл стерильного 0,85% раствора натрия хлорида, добавить 1,0 мл исходной микробной суспензии, тщательно перемешать (плотность суспензии довести до 0,5 ед. MacFarland).

3.3. На поверхность подсушенного агара внести пипеткой подготовленную микробную суспензию (1-2 мл на чашки диаметром 90 мм; 0,75-1,0 мл на чашки диаметром 60 мм), аккуратно покачивая распределить жидкость по всей поверхности агара, избыток жидкости собрать с поверхности агара пипеткой и удалить в дез.раствор.

3.4. Профламбированным пинцетом поместить в центр подготовленной чашки диск с новобиоцином (допустимо совместить постановку пробы с определением антибиотикочувствительности штамма).

3.5. После увлажнения диска чашку немедленно поместить в термостат и инкубировать вверх дном при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ от 18 до 24 часов.

Х. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

а) Учет результатов биохимических свойств проводить визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) после инкубации до 24 часов. Учет теста на наличие β -глюкозидазы проводить дважды – через 3-4 часа и через 24 часа инкубации, т.к. у отдельных штаммов он проявляется быстро и изменение цвета пропадает к концу инкубации. Учет РПК можно проводить дважды (если используются две лунки на одну культуру): через 4 часа и после инкубации до 24 часов, т.к. образование сгустка плазмы у разных штаммов происходит в разное время. Учет резистентности к новобиоцину проводить через 18-24 часа.

По окончании инкубации добавить в лунки Н второго ряда 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 G второго ряда по 0,05 мл (или 1 каплю из флакона-капельницы) реактив для теста «нитраты». Немедленно провести учет результатов по критериям цветового указателя (таблица 3).

Для учета РПК в лунки вспомогательного планшета с кроличьей плазмой внести по 1 капле солевого раствора фуксина. Учет провести немедленно. При положительном результате РПК капля краски будет лежать на поверхности сгустка, при отрицательном результате РПК капля краски окрасит всю лунку.

Учет резистентности к новобиоцину: при наличии зоны задержки роста < 16 мм - штамм резистентный (R), при наличии зоны задержки роста > 16 мм – штамм чувствительный (S).

Цветовой указатель

Лунка	Название теста	Обозначение теста	Цвет растворенного субстрата	Критерии оценки	
				Положительный результат	Отрицательный результат
				Смена окраски субстрата на:	
Первый ряд					
A	Утилизация маннита	MHT	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
B	Утилизация сахарозы	CAH	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
C	Утилизация трегалозы	TRE	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
D	Утилизация лактозы	LAK	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
E	Утилизация мальтозы	MAL	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
F	Утилизация маннозы	MAN	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
G	Утилизация арабинозы	ARA	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
H	Утилизация ксилозы	KSI	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
Второй ряд					
A	Утилизация рибозы	РИБ	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
B	Утилизация целлобиозы	ЦЕЛ	Красный	Желтый, оранжевый	Красный
C	Наличие β -глюкозидазы	β -ГЛЮ	Бесцветный	Лимонно-желтый	Бесцветный, мутный
D	Наличие фосфатазы	ФОС	Бесцветный, бледно-желтый	Желтый	Бесцветный, бледно-желтый
E	Наличие аргининдигидролазы	АРГ	Оранжевый	Красный, малиновый	Оранжевый
F	Наличие уреазы	УРЕ	Желтый	Красный, малиновый	Желтый, оранжевый
G	Наличие нитратредуктазы	НИТ	Бесцветный	Ярко-розовый, коричневый	Бесцветный
H	Образование ацетилметилкарбинола	АМК	Бесцветный, желтоватый	Розовый, малиновый	Желтоватый

Наличие РПК	РПК		Капля солевого раствора фуксина лежит на сгустке	Капля солевого раствора фуксина окрашивает всю лунку
Резистентность к новобиоцину	R Nvb		Зона задержки роста < 16 мм – штамм резистентный (R)	Зона задержки роста > 16 мм – штамм чувствительный (S)

б) Идентификацию культур микроорганизмов проводить с использованием таблицы биохимических свойств стафилококков, дифференциального «ключа» (прилагаются) и каталога кодов. Следует учитывать всю дополнительную информацию (характер колоний, гемолиз, наличие пигмента, микроскопию и др.).

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

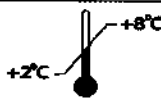
XI. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности указан на упаковке набора. После истечения срока годности 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.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять 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.

ХП. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

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

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



В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
Зав.кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России
д.м.н, профессор



Подпись 
удостоверяю:
Специалист по лаб. РМАПО
Подпись 
"10" 12 2012 года



Handwritten signature and scribbles over the stamps.