

**ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера**
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14
<http://www.dntpasteur.ru>, E-mail: dntpasteur@yandex.ru
телефакс (812) 313-69-89, 233-17-03
телефон (812) 313-69-88, 325-27-10

УТВЕРЖДЕНО
Ученым советом
ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии
имени Пастера
«26» января 2015 г.

**Для научных
исследований**

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА СРЕД И РЕАКТИВОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ МИКРООБЪЕМНОЙ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

«Рapid-Энтеро 200 М»

(ТУ 9398-013-01967164-2015)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор сред и реактивов «Рapid-Энтеро 200 М» предназначен для быстрой (4 – 5) ч биохимической идентификации наиболее часто встречающихся в практике видов и родов энтеробактерий – возбудителей гнойно-септических и острых кишечных инфекций.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест-система “РАПИД-ЭНТЕРО 200 М” основана на микрообъемной технологии с использованием жидких дифференциальных сред. Дифференциальные среды содержат только те субстраты, ферментация которых бактериями завершается немедленно или при инкубации в течение 4 ч. Ускорение исследования достигается также за счет большой посевной дозы бактерий и малого объема среды. Результаты учитываются визуально по изменению окраски среды. Идентификацию бактерий по результатам тестов производят по таблице.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

1. Стерильные питательные среды во флаконах с капельницами:

- 1.1 Среда с эскулином, 18 мл 2 фл.
- 1.2 Среда на уреазу, 18 мл 2 фл.
- 1.3 Среда с маннозой, 18 мл 2 фл.
- 1.4 Среда с арабинозой, 18 мл 2 фл.
- 1.5 Среда на лизиндекарбоксилазу, 18 мл 2 фл.
- 1.6 Среда на орнитиндекарбоксилазу, 18 мл 2 фл.
- 1.7 Среда с лактозой, 18 мл 2 фл.
- 1.8 Среда с сахарозой, 18 мл 2 фл.
- 1.9 Среда с адонитом, 18 мл 2 фл.
- 1.10 Среда на триптофандезаминазу, 18 мл 2 фл.
- 1.11 Среда на индол, 18 мл 2 фл.
- 1.12 Среда с маннитом и нитратом, 18 мл 2 фл.
- 1.13 Среда с глюкозой, на ферментацию, 18 мл 2 фл.

2. Реактивы:

- 2.1 Реактив на триптофандезаминазу, 18 мл 1 фл.
- 2.2 Реактив на индол (реактив Ковача), 18 мл 1 фл.
- 2.3 Реактив на нитратредуктазу № 1, 18 мл 1 фл.
- 2.4 Реактив на нитратредуктазу №2, 18 мл 1 фл.

2.5 Реактив на цитохромоксидазу, 10 мг	10 проб.
2.6 Реактив на тест “тяжа”, 9 мл	1 фл.
2.7 Вазелиновое масло, 18 мл.....	3 фл.
3. Полистироловые 96-луночные планшеты	30 шт.
4. Бланки учетов результатов	200 шт.
5. Инструкция по применению	1 шт.

Тест-система обеспечивает постановку 16 различных тестов:

- 1) экспрессное определение: цитохромоксидазы, ферментации глюкозы, феномена “тяжа” грамтрицательных бактерий;
- 2) выявление: индола, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, триптофандезаминазы, уреазы, нитратредуктазы;
- 3) ферментации: адонита, арабинозы, маннита, эскулина, маннозы, сахарозы, лактозы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При работе с чистыми культурами набор обеспечивает родовое и видовое выявление энтеробактерий.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор «Рапид-Энтеро50 М» предназначен только для *in vitro* диагностики. Входящие в компоненты набора вещества инаktivированы и безопасны. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 и СанПиН 2.1.7.2790-10.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Термостат, поддерживающий температуру 37±1 °С;
- дозаторы пипеточные с объемом 5-50 мкл, 50-200 мкл, 100-1000 мкл;
- горелка газовая (спиртовка);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследованию подлежат чистые культуры, выросшие из отсевов колоний со сред выделения на секторах питательного агара (или питательного агара с 15% желчи, ингибирующей рост протей).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Реактивы на триптофандезаминазу, нитратредуктазу №1, нитратредуктазу №2 и индол готовы к немедленному использованию.

Реактив на цитохромоксидазу в виду краткого срока годности готовят небольшими порциями. Для этого в пробирку 2.5, содержащую 10 мг N,N-диметил-п-фенилендиамина вносят 1 мл дистиллированной воды.

7.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД

Стерильные среды содержат все необходимые ингредиенты и готовы к немедленному использованию

7.3. ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА

7.3.1. Предварительная групповая идентификация

Проводится для определения возможной принадлежности к энтеробактериям экспресс-тестами: на цитохромоксидазу, тест «тяжа» на грамотрицательные бактерии, на ферментацию глюкозы.

Определение цитохромоксидазы по Ковачу.

На поверхность чашки Петри наносят с помощью пипетки крупную каплю реактива на цитохромоксидазу из пробирки 2.5. Набирают запаянным изогнутым концом пастеровской пипетки часть газона испытуемой культуры (петлю из нихромовой проволоки применять нельзя) и помещают на сухую поверхность чашки рядом с каплей реактива. Тем же концом пипетки перемещают каплю реактива на комочек бактерий.(не растирать).

Учет результатов проводят через 1 мин. При наличии цитохромоксидазы комочек бактерий окрашивается в красный цвет, при отсутствии цитохромоксидазы окраска испытуемого образца не изменяется.

Определение ферментации глюкозы.

Ферментация глюкозы проходит на среде Клиглера. В лунки планшета, используемого только для данного теста или в пробирку типа Эппендорф, вносят 4 капли среды с глюкозой (флакон 1.13). Исследуемую агаровую культуру бактерий вносят полной петлей в среду для ферментации глюкозы и перемешивают. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С 1 час.

Контроль: та же среда без посева бактерий.

Учет результатов: изменение исходного красного цвета среды на желтый в опытной лунке (пробирке) через 1 час указывает на ферментацию глюкозы бактериями.

Выявление грамотрицательных бактерий тестом «тяжа».

На поверхность чашки Петри наносят крупную каплю реактива на тест «тяжа» из флакона 2.6. В нее вносят полную петлю исследуемой культуры и растирают в капле петлей, периодически поднимая петлю из капли вверх на несколько сантиметров.

Учет результатов: культура бактерий считается грамотрицательной, если за петлей тянется нить слизи. При сомнительных результатах следует окрасить бактерии по методу Грама.

К энтеробактериям относятся оксидазонегативные (отсутствие цитохромоксидазы), ферментирующие глюкозу и грамотрицательные бактерии. Их подвергают дальнейшему биохимическому исследованию на родовую и видовую принадлежность.

7.3.2. Биохимическая идентификация бактерий в планшетах

Питательные среды вносят в лунки планшета в день исследования, выдавливая по 4 капли из капельниц 1.1-1.12. Среда для изучения одной культуры размещают в вертикальных рядах 1-12 из 8 лунок каждый в постоянной последовательности:

- 1 ряд – среда с эскулином (фл. 1.1);
- 2 ряд – среда на уреазу (фл. 1.2);
- 3 ряд – среда с маннозой (фл. 1.3);
- 4 ряд – среда с арабинозой (фл. 1.4);
- 5 ряд – среда на лизиндекарбоксилазу (фл. 1.5);
- 6 ряд – среда на орнитиндекарбоксилазу (фл. 1.6);
- 7 ряд – среда с лактозой (фл. 1.7);
- 8 ряд – среда с сахарозой (фл. 1.8);
- 9 ряд – среда с адонитом (фл. 1.9);
- 10 ряд – среда на триптофандезаминазу (фл. 1.10);
- 11 ряд – среда на индол (фл. 1.11);
- 12 ряд – среда с маннитом и нитратом (фл. 1.12);

Исследуемые культуры вносят в горизонтальные ряды А-Н из 12 лунок каждый. Одну культуру вносят по полной стандартной петле в каждую лунку со средой и перемешивают. Петлю прожигают только в начале и конце посева на весь ряд. Количество культур соответствует количеству рядов плюс один ряд контрольный (без посева).

В лунки вертикальных рядов 2, 5 и 6, содержащих исследуемые культуры со средами на уреазу, лизиндекарбоксилазу и орнитиндекарбоксилазу соответственно, вносят по 2 капли вазелинового масла из флакона 2.7. Планшеты закрывают крышкой и инкубируют при температуре 37⁰С.

Через (4-5) ч инкубации в лунки со средой на триптофандезаминазу (ряд 10) вносят по 2 капли реактива на триптофандезаминазу (фл. 2.1), в лунки со средой на индол (ряд 11) вносят по 2 капли реактива на индол (фл. 2.2), а в лунки со средой на манит и нитратредуктазу (ряд 12) вносят по 2 капли реактива на нитратредуктазу №1 (фл. 2.3) и по 2 капли реактива на нитратредуктазу №2 (фл. 2.4).

8. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводить поэтапно: через (1-3) мин, через 1 ч, 2 ч и (4-5)ч.

Результаты визуальных наблюдений окраски растворов в лунках вертикальных рядов и контрольных лунках оценивают согласно **табл.1** и вносят в бланки учета результатов.

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Утилизация отходов после использования набора реагентов осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790–10 («Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор РАПИД-ЭНТЕРО 200 М следует хранить при температуре 2-8 ⁰С, кроме упаковки с планшетами, в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 12 мес.

После вскрытия сред срок годности - 2 мес.

После приготовления реактива на цитохромоксидазу срок годности 7-10 суток.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора РАПИД-ЭНТЕРО 200 М следует обращаться в ФБУН НИИЭМ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу:

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, тел. (812)3136988, тел/факс (812)3136989

E-mail: dntpasteur@yandex.ru

Таблица 1

Временная последовательность учета результатов биохимических исследований

Время учета результатов	№ вертикаль-ного ряда	Тест	Визуальная оценка	
			Окраска в лунке при положительной реакции	Окраска в контрольной лунке
Через 2 мин, через 1 и 5 ч после посева	2	На уреазу	Малиновая [+<1] через 2 мин [+1] через 1 ч [+] через 5 ч	[-] Желто-оранжевая
Через 2 и 5 ч после посева	1	На гидролиз эскулина	Черная [+2] через 2 ч [+] через 5 ч	[-] Светло-серая
Через 2 и 5 ч после посева	5	На лизинде-карбоксилазу	Сине-зеленая или синяя [+2] через 2 ч [+] через 5 ч	[-] Желто-зеленая
Через 4-5 ч после посева	3 7 8 4 9	На ферментацию: маннозы лактозы сахарозы арабинозы адонита	[+] Желтая	[-] Красная
Через 4-5 ч после посева	6	На орнитинде-карбоксилазу	[+] сине-зеленая или синяя	[-] Желто-зеленая
	12	На маннит	[+] Желтая	[-] Красная
Через 4-5 ч после посева	10	На триптофан-дезаминазу	[+] Темно-коричневая или бурая через 1-2 мин после внесения реактива	[-] Светло-желтая
Через 4-5 ч после посева	11	На индол	[+] Красное кольцо на поверхности через 1-3 мин после внесения реактива	[-] Светло-желтая (без кольца)
Через 4-5 ч после посева	12	На нитрат-редуктазу	[+] Красно-бурая через 1-3 мин после внесения реактивов №1 и №2	[-] Светло-желтая

Таблица 2

Идентификация энтеробактерий

Род, вид бактерий	Номера лунок и тесты												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Эскулин	Уреаза	Манноза	Арабиноза	Лизиндекарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Лактоза	Сахароза	Адонит	Триптофандеаминаза	Индол	Маннит	Нитратредуктаза
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>K. pneumonia subsp. pneumoniae</i>	+2	±	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>K. mobilis</i>	+2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Enterobacter spp.</i>	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Serratia lignifaciens</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	+	+2	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Kluyvera ascorbata</i>	+	-	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> **	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>P. mirabilis</i> **	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>P. penneri</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. stuartii</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>P. alcalifaciens</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>Morganella morganii</i>	-	+<1	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+1	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+2	+1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i> **	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>C. koseri (diversus)</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>C. amalonicus</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	±	+	±	±	-	-	+	+	+
<i>Shigella spp.</i>	-	-	+	±	-	+	-	-	-	-	+	±	+

Обозначения: +<1 положительный результат за 2 мин; +1 положительный результат за 1 ч; +2 положительный результат за 2 ч; + положительный результат за 4-5 ч; ± положительный результат у более 50% штаммов; +̄ положительный результат у менее 50% штаммов; - отрицательный результат.