

Федеральное бюджетное учреждение науки  
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА**  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
**(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)**  
197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14. Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10  
e-mail: [pasteur@pasteurorg.ru](mailto:pasteur@pasteurorg.ru); [www.pasteurorg.ru](http://www.pasteurorg.ru)  
ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

*Для научных  
исследований*

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА СРЕД И РЕАКТИВОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ  
МИКРООБЪЕМНОЙ БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ (Рапид-Энтеро 200 М)  
Комплект №2 по ТУ 013-01967164-2015**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор сред и реактивов Рапид-Энтеро 200 М предназначен для быстрой (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 ДЕЙСТВИЯ**

Проведение исследований с использованием данного набора основано на определении биохимических свойств наиболее часто встречающиеся в медицинской практике энтеробактерий. Результаты, которые учитываются визуально по изменению цвета сред в лунках планшетов, позволяют идентифицировать энтеробактерии до рода и вида.

**2.2. СОСТАВ НАБОРА**

**1. Стерильные питательные среды во флаконах с капельницами:**

1.1	Среда с эскулином, 20 мл .....	2 фл.
1.2	Среда на уреазу, 20 мл .....	2 фл.
1.3	Среда с маннозой, 20 мл .....	2 фл.
1.4	Среда с арабинозой, 20 мл.....	2 фл.
1.5	Среда на лизиндекарбоксилазу, 20 мл .....	2 фл.
1.6	Среда на орнитиндекарбоксилазу, 20 мл .....	2 фл.
1.7	Среда с лактозой, 20 мл .....	2 фл.
1.8	Среда с сахарозой, 20 мл .....	2 фл.
1.9	Среда с адонитом, 20 мл .....	2 фл.
1.10	Среда на триптофандезаминазу, 20 мл.....	2 фл.
1.11	Среда на индол, 20 мл .....	2 фл.
1.12	Среда с маннитом и нитратом, 20 мл .....	2 фл.
1.13	Среда с глюкозой, 20 мл .....	2 фл.

**2. Реактивы:**

2.1	Реактив на триптофандезаминазу, 20 мл .....	1 фл.
2.2	Реактив на индол (реактив Ковача), 20 мл.....	1 фл.
2.3	Реактив на нитратредуктазу № 1, 20 мл.....	1 фл.
2.4	Реактив на нитратредуктазу №2, 20 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, 20 мл.....	3 фл.
3.	Полистироловые 96-луночные планшеты .....	30 шт.
4.	Пленка для заклейки планшетов.....	30 шт.
5.	Бланки учета результатов .....	200 шт.
6.	Крышка-капельница.....	3 шт.

7. Инструкция по применению ..... 1 шт.

Набор обеспечивает постановку 16 различных тестов:

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

### **3. ТЕХНИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Набор Рапид-Энтеро 200 М содержит флаконы с дифференциальными средами. После внесения исследуемых культур микроорганизмов и накопления продуктов их метаболизма происходит изменение цвета сред (положительная реакция). При отсутствии продуктов метаболизма изменения цвета сред не происходит (отрицательная реакция).

### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор Рапид-Энтеро 200 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  $36 \pm 1^\circ \text{C}$ ;
- дозаторы пипеточные с объемом 5-50 мкл, 50-200 мкл, 100-1000 мкл;
- калиброванные бактериальные петли;
- горелка газовая или спиртовая;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72).

### **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Исследованию подлежат чистые культуры, выращенные в течение 18-24 ч. при температуре  $36 \pm 1^\circ \text{C}$  из отсеков колоний со сред выделения на секторах питательного агара (или питательного агара с 15% желчи, ингибирующей рост протей).

### **7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **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. 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 часть газона испытуемой культуры петлей полимерной одноразовой (петлю из нихромовой проволоки применять нельзя) и помещают на сухую поверхность чашки рядом с каплей реактива. Той же петлей 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 (флаконе 1.13). Исследуемую агаровую культуру бактерий вносят полной петлей в среду с глюкозой и перемешивают. Посевы инкубируют при температуре 37 °С 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.

### **7.4. РОДОВАЯ И ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

**Внесение среды в лунки.** 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);

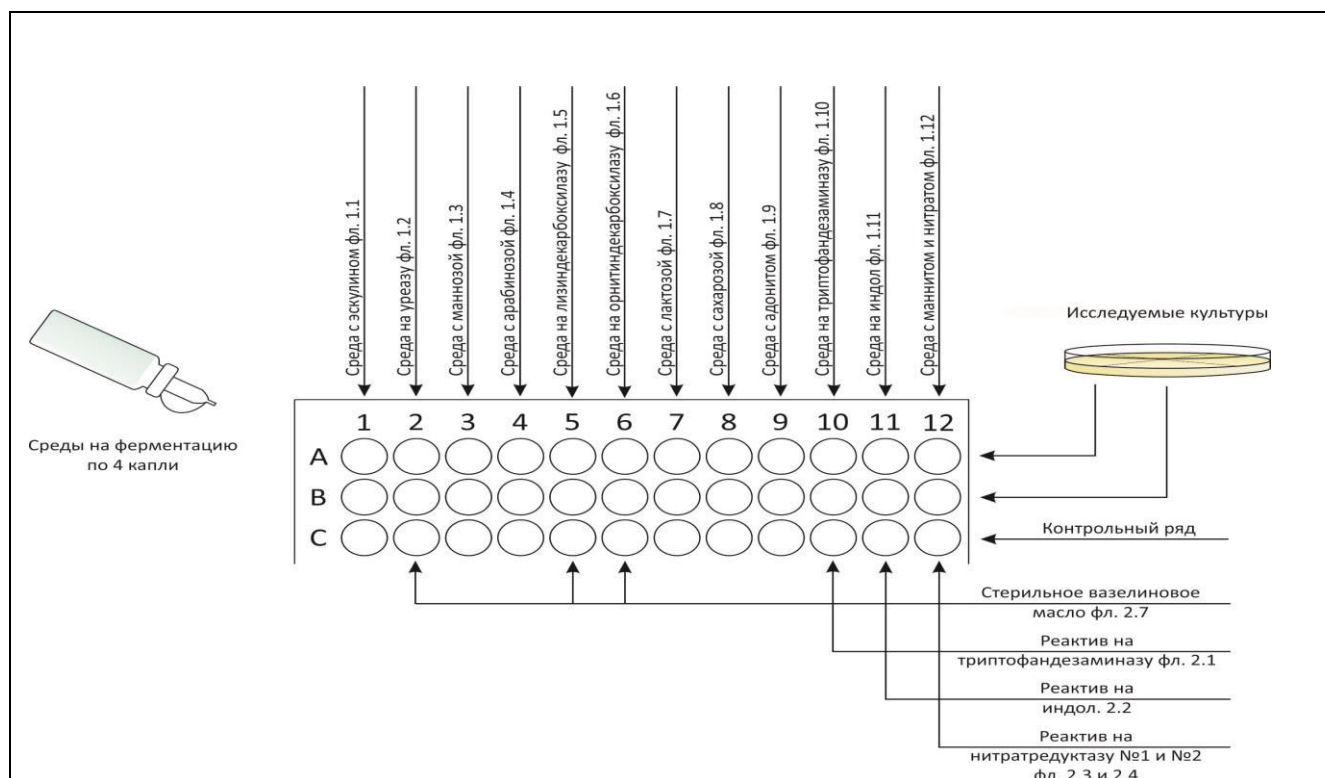
Исследуемые культуры вносят в горизонтальные ряды А-Н из 12 лунок каждый (рис. 1). Одну культуру вносят по полной стандартной петле в каждую лунку со средой и перемешивают. Петлю прожигают только в начале и конце посева на весь ряд. Количество культур соответствует количеству рядов плюс один ряд контрольный (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 плёнкой и инкубируют при температуре 37°С.

#### **Внесение реактивов через 5 ч инкубации (рис.1).**

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).

**Рис.1 Родовая и видовая идентификация.**



## 8. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Идентификацию культур микроорганизмов проводят с использованием **табл.2**.

## 10. 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»).

## 11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение и транспортирование: в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C, допускается при температуре до 25 °С не более 2 недель.

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, следует обращаться в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.

Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 232-92-17.

e-mail: [pasteur@pasteurorg.ru](mailto:pasteur@pasteurorg.ru); [www.pasteurorg.ru](http://www.pasteurorg.ru).

**Таблица 1**

**Временная последовательность учета результатов биохимических исследований**

Время учета результатов	№ вертикального 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 лизин-декарбоксилазу	Сине-зеленая или синяя [+2] через 2 ч [+] через 5 ч	[-] Желто-зеленая
Через 5 ч после посева	3 7 8 4 9 12	На ферментацию: маннозы лактозы сахарозы арабинозы адонита маннита	[+] Желтая	[-] Красная
Через 5 ч после посева	6	На орнитин-декарбоксилазу	[+] сине-зеленая или синяя	[-] Желто-зеленая
Через 5 ч после посева	10	На триптофан-деаминазу	[+] Темно-коричневая или бурая через 1-2 мин после внесения реактива	[-] Светло-желтая
Через 5 ч после посева	11	На индол	[+] Красное кольцо на поверхности через 1-3 мин после внесения реактива	[-] Светло-желтая (без кольца)
Через 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. amalonticus</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.