

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов «Мультимикротесты
для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ E24)»

1. Назначение.

Набор ММТ E24 предназначен для определения биохимической активности энтеробактерий, выделяемых в ходе бактериологического анализа, и их идентификации до вида.

Набор рассчитан на проведение 12 анализов.

2. Принцип метода.

Идентификация энтеробактерий с помощью набора ММТ E24 основана на определении у этих микроорганизмов ферментных систем, действующих на соответствующие субстраты.

Набор ММТ E24 позволяет определить следующие биохимические свойства энтеробактерий: наличие уреазы, образование индола, наличие лизиндекарбоксилазы, утилизацию маннита, цитрата натрия, сахарозы, инозита, наличие фенилаланиндезаминазы, образование сероводорода, наличие аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, утилизацию лактозы, малоната натрия, сорбита, дульцита, мальтозы, наличие β -галактозидазы, утилизацию арабинозы, рамнозы, адонита, рафинозы, салицина, глюкозы, наличие нитратредуктазы.

3. Состав набора.

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет полимерный с крышкой стрипованный маркированный с ММТ E24, состоящий из четырех трехрядных блоков, заклеенных прозрачной, влагонепроницаемой, нетоксичной, стерильной пленкой (далее по тексту - защитная пленка) - 3 шт.;

- масло вазелиновое стерильное – вязкая прозрачная бесцветная или с желтоватым оттенком жидкость, 8 мл - 1 флакон^[1];

- реактив по Эрлиху - прозрачная жидкость светло-желтого или желтого цвета, 2,5 мл - 1 флакон^[1];

- раствор хлорида железа (III) 10% - прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета, 2,5 мл - 1 флакон;

- раствор риванола 1% - прозрачная жидкость желтого или желто-коричневого цвета, 2,5 мл - 1 флакон;

- раствор кислоты хлористоводородной 1% - прозрачная бесцветная жидкость, 2,5 мл - 1 флакон.

4. Анализируемые образцы.

Материалом для исследования служат культуры бактерий, выделенные из нативного материала (испражнения, моча, рвотные массы, желчь, дуоденальное содержимое, грудное молоко, мокрота, содержимое розеол и др., а также отделяемое ран, абсцессов, пробы пищевых продуктов, воды, смывы с объектов окружающей среды).

Подозрительные колонии, выросшие на средах для первичной дифференциации энтеробактерий (среда Олькеницкого, Клиглера, висмут-сульфит-агар и др.), используют для идентификации или подращивания на питательном агаре в течение 18-24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

5. Меры предосторожности.

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

Культуры бактерий и использованные планшеты с ММТ Е24 обезвреживают в 3% растворе хлорамина Б или в 6% растворе перекиси водорода в течение 20-24 ч, или автоклавируют при температуре (120 ± 2) °С 1 ч.

Рамки и крышки планшетов, входящих в набор, после обеззараживания можно использовать повторно.

6. Оборудование, материалы, реагенты, необходимые при работе с набором:

- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки стеклянные мерные вместимостью 1,0-2,0 мл;
- резиновая груша;
- пробирки биологические;
- отраслевой стандартный образец мутности – 10 единиц;
- спиртовка;
- микробиологическая петля;
- штатив для пробирок;
- вода очищенная стерильная;
- маркировочный карандаш.

7. Подготовка к анализу.

Извлекают набор из холодильника. В рамку-держатель помещают необходимое количество блоков (1 блок - 1 анализ) и оставляют при комнатной температуре на 30-60 мин.

Для удобства в работе и исключения ошибок при внесении бактериальной суспензии блоки можно раздвинуть.

Для анализа используют чистую культуру энтеробактерий со скошенного питательного агара или со сред для первичной дифференциации, выращенную при температуре (37 ± 1) °С в течение 18-24 ч.

Если выделенная культура хранилась при температуре от 2 до 8 °С, производят предварительный посев ее на питательный бульон. Посев инкубируют 5-7 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем производят пересев культуры на скошенный питательный агар. Через 18-24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С производят повторный пересев в пробирки со скошенным питательным агаром и культивируют 18-24 ч.

Выросшую культуру используют для приготовления бактериальной суспензии в очищенной воде.

Доводят густоту суспензии до 10 единиц по отраслевому стандартному образцу мутности^[2]. При отсутствии стандартного образца, вносят 2-3 петли^[3] испытуемой культуры в 4 мл стерильной очищенной воды.

8. Проведение анализа.

Для проведения анализа одной культуры используют один блок.

На прилагаемом к набору бланке учета и на крышке планшета регистрируют номер засеваемой культуры.

Снимают защитную пленку с блока.

Во все лунки блока стерильной градуированной пипеткой вместимостью 1-2 мл вносят по 2-3 капли приготовленной суспензии^[4].

Для создания анаэробных условий вносят по 2 капли стерильного вазелинового масла в следующие лунки блока:

1А (Уре), 2А (H₂S);

1В (Инд), 2В (Арг);

1С (Лиз), 2С (Орн)

Блок заклеивают защитной пленкой.

Для изучения оставшихся культур все операции анализа повторяют на других блоках.

Планшет с посевами закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 3-5 ч и 18-24 ч.

Оставшиеся неиспользованные блоки ММТ Е24 хранят в закрытых полиэтиленовых паке-

тах до окончания срока годности при температуре от 2 до 8 °С.

9. Учет результатов.

Учет результатов проводят визуально в соответствии с цветовым указателем (таблица 1) через 18-24 ч инкубации^[см. цв. приложение]. Снимают с блока защитную пленку и помещают в дезинфицирующий раствор.

По окончании инкубации добавляют реактивы в следующие лунки блока:

- 1В (Инд) для выявления индолообразования - 1-2 капли реактива по Эрлиху;
- 1Н (Фен) для выявления фенилаланиндезаминазы - 1 каплю 10% раствора хлорида железа (III);
- 3Н (Нит) для выявления нитратредуктазы - 1 каплю 1% раствора риванола, затем 1 каплю 1% раствора кислоты хлористоводородной.

Реакции учитывают немедленно после добавления реактивов.

Идентификацию проводят с помощью таблицы 2 «Биохимическая характеристика энтеробактерий» и таблицы 3 «Ключ для идентификации энтеробактерий» с учетом данных по характеру роста, микроскопии, источников изоляции и др.

В случае сомнительного результата тестов анализ повторяют в двух параллельных исследованиях.

Таблица 1

Цветовой указатель ММТ Е24

№ лунок	Тесты	Сокращения	Цвет растворенного в очищенной воде субстрата	Реакция	
				положительная	отрицательная
1	2	3	4	5	6
1 ряд					
1А	наличие уреазы	УРЕ	желтый	розовый, малиновый	желтый, оранжевый, бледно-розовый
1В	образование индола	ИНД	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный, желтый
1С	наличие лизиндекарбоксилазы	ЛИЗ	желтый, зеленый	синий, бирюзовый	желтый, зеленый, бледно-голубой
1D	утилизация маннита	МАН	красный	желтый, оранжевый	красный
1E	утилизация цитрата натрия	ЦИТ	желтый, зеленый	синий, бирюзовый	желтый, зеленый, бледно-голубой
1F	утилизация сахарозы	САХ	красный	желтый, оранжевый	красный
1G	утилизация инозита	ИНО	красный	желтый, оранжевый	красный
1Н	наличие фенилаланиндезаминазы	ФЕН	бесцветный	зеленый, темно-зеленый	бледно-желтый, бесцветный

продолжение таблицы 1

№ лунок	Тесты	Сокращения	Цвет растворенного в очищенной воде субстрата	Реакция	
				положительная	отрицательная
1	2	3	4	5	6
2 ряд					
2A	образование сероводорода	H ₂ S	бесцветный	черный, темно-серый	бесцветный, светло-серый
2B	наличие аргининдигидролазы	АРГ	желтый, зеленый	синий, бирюзовый	желтый, зеленый, бледно-голубой
2C	наличие орнитиндекарбоксилазы	ОРН	желтый, зеленый	синий, бирюзовый	желтый, зеленый, бледно-голубой
2D	утилизация лактозы	ЛАК	красный	желтый, оранжевый	красный
2E	утилизация малоната натрия	МАЛ	желтый, зеленый	синий, бирюзовый	желтый, зеленый, бледно-голубой
2F	утилизация сорбита	СОР	красный	желтый, оранжевый	красный
2G	утилизация дульцита	ДУЛ	красный	желтый, оранжевый	красный
2H	утилизация мальтозы	МАТ	красный, малиновый	желтый, оранжевый	красный, малиновый
3 ряд					
3A*	наличие β-галактозидазы	ГАЛ	бесцветный	желтый	бесцветный
3B	утилизация арабинозы	АРА	красный, малиновый	желтый, оранжевый	красный, малиновый
3C	утилизация рамнозы	РАМ	красный, малиновый	желтый, оранжевый	красный, малиновый
3D	утилизация адонита	АДО	красный	желтый, оранжевый	красный
3E	утилизация рафинозы	РАФ	красный	желтый, оранжевый	красный
3F	утилизация салицина	САЛ	красный	желтый, оранжевый	красный
3G	утилизация глюкозы	ГЛЮ	красный, малиновый	желтый, оранжевый	красный, малиновый
3H	наличие нитратредуктазы	НИТ	бесцветный	темно-бордовый	бесцветный, желтый

* - учет теста на β-галактозидазу проводят дважды: через 3-5 ч, не снимая пленку, и через 18-24 ч.

10. Форма выпуска.

Набор ММТ Е24 рассчитан на проведение 12 анализов: 3 планшета ММТ Е24, 1 флакон с вазелиновым маслом, 1 флакон с реактивом по Эрлиху, 1 флакон с 10% раствором хлорида железа (III), 1 флакон с 1% раствором риванола, 1 флакон с 1% раствором кислоты хлористоводо-

родной.

Набор помещен в коробку из картона коробочного. В коробку вложены: Инструкция по применению, таблица 2 «Биохимическая характеристика энтеробактерий», таблица 3 «Ключ для идентификации энтеробактерий», 12 бланков учета результатов.

11. Срок годности, условия хранения и транспортирования.

Срок годности 1 год. Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Препараты хранят и транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование и хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

По вопросам, касающимся качества набора ММТ Е24, следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс» по адресу: 355003, г. Ставрополь, ул. Ленина, 384, тел/факс (8652) 28-34-60.

и в ФГУН «Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора по адресу: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22.

Примечания

[1]. К флакону с вазелиновым маслом и реактивом по Эрлиху прилагаются стерильные крышки-капельницы с принудительным каплеобразованием.

[2]. При отсутствии отраслевого стандартного образца мутности возможно применение стандарта мутности по МакФарланду 1 как коммерческого, так и приготовленного самостоятельно.

[3]. Используется петля микробиологическая объемом 10 мкл.

[4]. **Обратите внимание:** при проведении анализа объем вносимой в лунки бактериальной суспензии должен быть - 0,15 мл. Для создания анаэробных условий объем вазелинового масла должен быть 0,1 - 0,15 мл (не менее 2 капель).

Приложение

№ лунки	+	-	№ лунки	+	-	№ лунки	+	-
1А УРЕ			2А Н ₂ S			3А* ГАЛ		
1В ИНД			2В АРГ			3В АРА		
1С ЛИЗ			2С ОРН			3С РАМ		
1D МАН			2D ЛАК			3D АДО		
1Е ЦИТ			2Е МАЛ			3Е РАФ		
1F САХ			2F СОР			3F САЛ		
1G ИНО			2G ДУЛ			3G ГЛЮ		
1H ФЕН			2H МАТ			3H НИТ		

* учет теста на β-галактозидазу проводят дважды: через 3-5 ч, не снимая пленку, и через 18-24 ч.