

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И СТАФИЛОКОККОВ

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

**Нижний Новгород
2007**

Сасова В.А., ООО "НПО "Диагностические системы"
Залесских Н.В., к.м.н. ООО "НПО "Диагностические системы"

Содержание

Введение	4
1. Классические методы идентификации.	6
2. Ускоренные методы идентификации.	7
3. Стабильные тест-системы с большим количеством тестов.	7
4. Выбор комплекса ключевых признаков необходимого для одноэтапной идентификации энтеробактерий и стафилококков до вида.	10
5. Общая характеристика ПБДЭ, ПБДС.	12
6. Способ применения ПБДЭ.	13
7. Способ применения ПБДС.	17
8. Наиболее частые причины ошибок при идентификации бактерий с использованием ПБДЭ и ПБДС.	20
9. Каталог кодов и принцип работы с ним.	21
10. Программное обеспечение для ПБДЭ, ПБДС к персональным компьютерам.	23
Литература.	24
Приложение 1	25

Введение

Одним из важных разделов диагностики инфекционных заболеваний является идентификация изолируемых культур микроорганизмов.

При определении таксономического положения патогенных и условно-патогенных бактерий большое значение имеет разработка ускоренных и наиболее доступных способов изучения характеризующих их свойств. Так как своевременно поставленный этиологический диагноз—это не только снижение стоимости лабораторного исследования, но и вовремя назначенная целенаправленная терапия, уменьшение внутрибольничных инфекций, снижение продолжительности пребывания больного в стационаре. Идентификация микроорганизмов чаще всего проводится по комплексам физиолого-биохимических признаков, описанных в специальном Определителе микробов ("Bergey's Manual of Systematic Bacteriology").

Энтеробактерии на протяжении всей истории медицинской бактериологии являлись объектом постоянного внимания микробиологов, так как представители этого обширного семейства включают как сапрофитов, полезных симбионтов человека, так и патогенных бактерий—возбудителей острых кишечных инфекций: брюшного тифа, паратифов, сальмонеллезов, дизентерий, колиэнтеритов, эшерихиозов. В последнее десятилетие остро встала проблема заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, изолируемыми при острых кишечных инфекциях, менингитах, внутрибольничных гнойно-воспалительных заболеваниях респираторного, урогенитального трактов, постоперационных осложнений, этиологическими факторами которых

являются самые разнообразные "оппортунистические" микроорганизмы, в том числе: *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* и многие другие (Рис. 1)



Рис. 1. Кишечная палочка (*Escherichia coli*)

Введение в микробиологическую практику новых методов изучения бактерий, прежде всего связанных со структурой генома, создало новые возможности упорядочения классификации, привело к открытию новых видов и родов микробов. К настоящему времени уже известно 10 родов, 115 видов, 29 подвидов энтеробактерий, систематическое положение некоторых из них еще недостаточно определено. Это создает определенные сложности в работе практических лабораторий при осуществлении идентификации изолируемых штаммов бактерий. В качестве диагностических используются признаки по утилизации различных источников углерода или азота, выделению характерных продуктов метаболизма. Большое разнообразие родов и видов энтеробактерий затрудняет их дифференциацию и заставляет изучать широкий набор физиолого-биохимических признаков и их соответствие генотипу.

Оживление интереса микробиологов к идентификации стафилококков вызвано расширением видового состава данного рода и бесспорно доказана патогенетическая роль, не только коагулазоположительных, но и коагу-

лазоотрицательных стафилококков. Эти микроорганизмы вызывают инфекции кожных покровов, глаз, ушей, мочеполового тракта, системные инфекции (Рис.2)



Рис.2. Скопления стафилококков в культуре. Окраска по Граму

В составе рода в настоящее время признано 19 видов и несколько видов еще находится в исследовании.

Наиболее перспективна и приемлема для большинства микробиологических лабораторий идентификация бактерий по их ферментативной активности. Стремление к ускорению и стандартизации анализа реализовано разработкой большого числа различных диагностических систем для идентификации микроорганизмов, основанных на выявлении их ферментативных систем.

1. Классические методы идентификации.

Схема 1(Приложение 1).

Изучение биохимических свойств непосредственно в лабораториях связано с трудоемкими манипуляциями по приготовлению специальных диагностических питательных сред, требующих соблюдения строго заданных физико-химических условий, с использованием разнообразных субстратов и индикаторов.

Определение ассортимента применяемых для идентификации тестов также требует высокой квалификации микробиологов и нуждается в едином унифицированном подходе.

При использовании так называемых "пробирочных тестов" от постановки реакции до учета результатов уходит сутки, а иногда и несколько суток.

Для определения таксономического положения выделенных патогенных и условно-патогенных бактерий большое значение имеет бактериологический метод. Этот метод включает в себя использование накопительных или селективных (избирательных) питательных сред и условий культивирования для преимущественного накопления в культуре нужных форм микробов, способы выделения чистых культур из отдельных колоний или клеток микроорганизмов. Чистые культуры микробов изучаются с помощью комплекса культуральных, морфологических и физиолого-биохимических методов исследования.

Традиционный метод бактериологического анализа включает три основных этапа:

1—Посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами;

2—Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах;

3—Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, отношению к специфическим бактериофагам и антибиотикам.

Время проведения анализа составляет от 72 часов до 4-5 суток. Такие сроки не удовлетворяют ни клиницистов ни эпидемиологов. Последние 20 лет исследователи активно занимаются разработкой новых методов ускоренной диагностики. Для достижения цели ускорения анализа авторами используются разные подходы. Ряд исследователей идет по пути совершенствова-

ния и расширения 2-го этапа за счет сокращения 3-го—создание дифференциальных питательных сред на плотной агаровой основе в одной или нескольких пробирках. Это дает возможность осуществлять предварительную идентификацию выделенного микроорганизма. Начало этим разработкам положили двухсахарные среды Ресселя, 3-5 компонентные—Клиглера, Олькеницкого, однослойная среда Дукс.

За рубежом созданы коммерческие препараты—дифференциально-диагностические среды для простого, экономичного и достаточно быстрого определения ферментативной активности. Это—R-V система, множественная тест-система "Enterotube".

Применение такого подхода дает экономию времени, посуды. Однако количество ферментативных признаков, определяемых с помощью комплексных сред, все-таки ограничено и недостаточно для полной биохимической дифференцировки многих групп микроорганизмов, а также атипичных культур.

2. Ускоренные методы идентификации.

С целью усовершенствования 3-го этапа анализа—идентификация выделенных микроорганизмов взамен классического подхода—инокуляции культуры в пробирки, содержащие субстраты и индикаторы предложены электрофизические методы быстрого определения биохимических свойств микроорганизмов на жидких питательных средах. Они основаны на изменении электропроводности и других физико-химических свойств в зависимости от рН раствора при ферментативных реакциях.

Еще один из подходов усовершенствования этого этапа—применение

ингибиторов роста. В качестве ингибиторов предложен набор анти-микробных агентов, в том числе антибиотиков, соли некоторых металлов (кобальт), анилиновые красители. Этот метод используется в системе Auto-bac-ID. Однако, возможности этого подхода еще нуждаются в дальнейшем изучении, особенно в связи с развитием у микроорганизмов множественной резистентности к подобным агентам.

3. Стабильные тест-системы с большим количеством тестов.

Наиболее широко стремление к стандартизации анализа реализуется разработкой большого числа различных видов тест-систем для одновременного определения большого числа биохимических признаков бактерий. По принципу изготовления и использования системы можно разделить на 4 группы:

1-я группа—системы с бумажной основой в виде диска, импрегнированного субстратом.

В Нижегородском НИИЭМ для идентификации энтеробактерий (Альтман Р.Ш.Лавровская В.М., 1975; Залесских Н.В., 1985) и стафилококков (Дегтева Г.К., Шубина З.В., Носова Т.В., 1991) были разработаны системы индикаторные бумажные (СИБ).

Системы индикаторные бумажные представляют собой диски или полоски бумаги, пропитанные соответствующими стандартными диагностическими средами, а также диски засвеченной и проявленной фотопленки. Они позволяют в любой практической лаборатории идентифицировать выделенные микроорганизмы до рода и вида.

За рубежом широко используются коммерческие системы с бумажной

основой в виде полосок Spot-test system (Miller, Wright, 1982), Patho-tec system (Borchardt, 1986, Edberg et al., 1982), дисков, помещенных в специальные планшеты готовые к немедленному использованию—Micro-ID (Edberg et al., 1979, Manford et al., 1982), Minitek (BBL Microbiology system, Cockeysrill, Md, Crouch S.F., Pearson T., Parham D.M., 1987).

Следует заметить, что внедрение в практику СИБ удовлетворяет требованиям стандартизации анализов и освобождает от приготовления в кустарных условиях питательных сред. Вместе с тем, использование СИБ практически не уменьшает трудоемкость работы бактериологов. Поэтому большие преимущества имеет планшетная тест-система, которая обеспечивает одноэтапную идентификацию до вида и требует от бактериолога лишь инокуляции исследуемой культуры.

2-я группа—системы с высушенными или замороженными субстратами в микроемкостях в виде специальных планшетов: API-20 E (Smith et al., 1972, Varhonyi, Teleki., 1984), Mikro Media (Barry et al., 1979), Enter-Set 20 (Mc Carthy., 1979, Aldridge Hodges, 1981), API- STAPH system (Reuter J.W.A, 1986), API- STAPH Ident (Hussain Z., et al., 1986, Hebert et al., 1988), "Микро-Ла-тест" фирмы "PLIVA-Lachema", ПБДЭ (Соколова К.Я., 1990), ПБДС (Власенко М.А., 1993), MMI-EI, MMI-E2 НПО "Аллерген" г. Ставрополь.

В Нижегородском НИИЭМ впервые разработаны отечественные одноразовые тест-системы для экспресс-идентификации энтеробактерий и стафилококков. ПБДЭ—пластина биохимическая дифференцирующая энтеробактерий по 20 признакам и ПБДС—пластина биохимическая дифференцирующая стафилококки по 17 признакам. С 1991 года НПО "Диагностиче-

ские системы" осуществляет коммерческий выпуск этих тест-систем.

Представители этой многочисленной группы, по сути являются заменой классических пробирочных сред. Удобные и быстрые методы инокуляции исследуемого материала, большой набор тестов (20-24), замена пробирок со средами, требующими определенных условий и места хранения, на планшеты, пеналы, где среды находятся в лиофилизированном состоянии делают эти системы готовыми к немедленному использованию с наименьшими затратами рабочего времени и проведению полной идентификации в лабораториях разного уровня.

Планшетные тест-системы представляют наибольший интерес и для дальнейшего развития исследований, так как наблюдение за изменением цветности использованных в ней реактивов позволило в дальнейшем подойти не только к визуальному, но и автоматическому учету результатов.

3-я группа—системы с твердыми пластинчатыми средами, некоторые из которых имеют специальные репликаторы для одномоментного заражения несколькими культурами и автоматическое считывание результатов.

4-я группа—автоматизированные тест-системы для идентификации микроорганизмов и экспрессного выявления степени их чувствительности к антибиотикам.

Таким образом, основное преимущество коммерческих идентификационных тест-систем—стандартизация и воспроизводимость в условиях одной лаборатории или лабораторий, использующих одну и ту же идентификационную систему. Надежность идентификации зависит от уровня стандартизации и воспроизводимости

тест-системы. Благодаря высокой воспроизводимости коммерческих систем они обеспечивают достаточно надежные результаты.

Само понятие "идентификационная система" может быть определено через перечисление ее компонентов:

1. набор тестов, предназначенных для идентификации определенной группы микроорганизмов;

2. компоненты необходимые для проведения отдельных процедур (средства для инокуляции, инкубационные камеры, реагенты, схемы для считывания результатов и т.д.)

3. схемы для интерпретации результатов.

Использование тест-систем снижает затраты на проведение анализа за счет сокращения времени, экономии реактивов, бактериологической посуды. И, наконец, коммерческие системы характеризуются относительной долговечностью. Большинство систем при соблюдении условий хранения не утрачивают своей специфической активности в течение одного-двух лет.

4. Выбор комплекса ключевых признаков необходимого для одноэтапной идентификации энтеробактерий и стафилококков до вида.

Системы с большим количеством тестов имеют тенденцию к более точной идентификации. Однако выпуск диагностических систем различной степени информативности также оправдан, т.к. они могут быть дифференцированно использованы в зависимости от задач исследования в лабораториях разного уровня.

При разработке тест-систем важнейшей проблемой является отбор тестов. Идеально система должна включать все тесты, необходимые для

выявления представителей какой-либо группы микроорганизмов.

В определителе Берги приводятся 43 биохимических признака основных групп энтеробактерий и 48 признаков, которыми охарактеризованы представители рода *Staphylococcus*. Такой широкий набор признаков предназначен для научных исследований, а в лабораторной практике значительно затрудняет работу бактериологов. На протяжении ряда лет исследователи занимаются подбором наиболее информативных признаков, позволяющих достоверно идентифицировать культуры при наименьшей затрате времени, тестов.

Общепризнаны как важные дифференциальные тесты для энтеробактерий, кроме ферментации глюкозы до кислоты и газа и лактозы еще пять: образование сероводорода, наличие фенилаланиндезаминазы, уреазы, утилизация цитрата и малоната натрия. Анализ возможностей такого набора свидетельствует об отсутствии дифференциации родов: *Escherichia*, *Shigella*, *Hafnia*, *Salmonella* и *Citrobacter*; *Klebsiella* и *Enterobacter*.

Дифференциация бактерий по ограниченному числу признаков (4-8) практически может иметь только ориентировочное значение. Более необходимой в практике является совокупность тестов, позволяющая надежно определить родовую принадлежность микроорганизма, что имеет основное диагностическое значение. В этом отношении большие возможности имеет комплекс числа признаков не менее 9-10, который включает в себя: определение лизиндекарбоксилазы, уреазы, образование сероводорода, индола, ферментация глюкозы, лактозы, утилизация цитрата натрия, малоната натрия, отсутствие или отсутствие подвижности. Схема 2 (Приложение 1).

Родовая принадлежность с помощью такого комплекса признаков устанавливается в 95,7% и в 63,2% случаях удается идентификация до вида.

Расширяют возможности идентификации поэтапные исследования, которые дают вначале ориентировочные данные по минимальному числу признаков, а затем определяют окончательную родовую, а в большинстве случаев видовую принадлежность на основании более широкой характеристики свойств. Такой подход рационален в некоторых случаях, хотя значительно удлиняет анализ. В практических целях представляет интерес проведение одноэтапной идентификации энтеробактерий до рода, а в большинстве случаев до вида. В этих случаях используют, как правило, от 11 до 14 тестов и более, что позволяет сократить сроки идентификации.

Введение дополнительных признаков (утилизация инозита, сорбита, орнитина, реакции Фогеса-Проскауэра) к описанному выше комплексу из 9 тестов (Залесских Н.В., 1985) повысило процент родовой идентификации до 100%, а видовой до 88,9%. Схема 3 (Приложение 1).

Следует заметить, что для математического отбора комплекса свойств, использовались штаммы, типичные по фенотипическим признакам. Действительно, типичные штаммы составляют большую часть идентифицируемых свежeweыделенных культур и на их выявление должно быть направлено усилие бактериолога.

Вместе с тем нельзя игнорировать и возможность выделения из естественного материала культур, отклоняющихся от фенотипа по тому или другому признаку. Поэтому дополнительное введение в 13-тестовый диагностический комплекс еще 7 тестов, позволяющих изучать способность

бактерий утилизировать цитрат натрия в присутствии глюкозы (аналог среды Христенсена), сахарозу, маннит, мальтозу, арабинозу, лактозу и аргинин, повысило процент видовой идентификации до 98,6% (Соколова К.Я., 1990.) Схема 4 (Приложение 1).

ПБДЭ содержит 20 тестов, позволяющих определить следующие биохимические свойства: утилизацию цитрата натрия как в присутствии сахара (модификация среды Христенсена), так и без него (среда Симонса), малоната натрия, глюкозы, лактозы, маннита, сахарозы, инозита, сорбита, арабинозы, мальтозы, фенилаланина, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола, наличие β -галактозидазы, уреазы, декарбоксилазы орнитина и лизина, гидролазы аргинина, которые позволяют с высокой степенью достоверности идентифицировать как типичные, так и отличающиеся по отдельным свойствам от типичных штаммы.

Отбор тестов для ПБДС также проводился с использованием математических методов и на основе анализа литературы. Во всех импортных коммерческих тест-системах используются тесты на наличие фосфатазы, уреазы и ферментации трегалозы, что свидетельствует о высокой дифференцирующей значимости этих тестов. При отборе также проводился расчет дифференцирующей силы для 48 тестов, представленных в определителе Берги.

Для видового определения представителей рода *Staphylococcus* было отобрано 17 тестов. Это тесты, позволяющие определить: утилизацию глюкозы (как положительный контроль), фруктозы, маннозы, мальтозы, лактозы, трегалозы, маннита, ксилозы, сахарозы, арабинозы, галактозы, салицина, образование ацетилметил-

карбинола, наличие уреазы, фосфатазы, нитратредуктазы, аргининдегидролазы (Власенко М.А., 1993).

При применении ПБДС идентификация до вида достигается в 86% случаях, что совпадает с зарубежными аналогами.

Коррелятивное сопоставление результатов, полученных с помощью ПБДЭ, ПБДС и дифференциально-диагностических сред традиционного приготовления проводилось на 156 штаммах стафилококков и 526 штаммах энтеробактерий. Сравнительные результаты определения биохимической активности стафилококков выявили корреляцию результатов от 86,5 до 100% (Власенко М.А., 1993), а у энтеробактерий 97,5% (Соколова К.Я., 1990).

5. Общая характеристика ПБДЭ, ПБДС.

Принцип функционирования ПБДЭ и ПБДС основан на микрокультуральных методах, которые позволяют не только обеспечивать высокую точность и воспроизводимость результатов, но и сокращают сроки исследований. Ускорение биохимических реакций в микрокультуральном методе достигается небольшим объемом ингредиентов при относительно большой концентрации засеваемой культуры.

ПБДЭ и ПБДС представляют собой панель с 20-ю конусообразными лунками, на дно которых нанесены соответствующие субстраты с индикатором, стабилизированные поливиниловым спиртом. Панель изготовлена из нейтральной полимерной пленки путем вакуумформования. Субстраты с индикатором вносят в лунки в жидком виде, затем высушивают и стерилизуют. Панель закрывается крышкой, изготовленной также из полимерной пленки.

Принцип конструирования дифференциально-диагностических тестов состоит из приготовления растворов специфических субстратов на основе фосфатных буферов. Индикаторы добавляемые в среду, позволяют визуально оценить результаты реакции в цвете.

6. Способ применения ПБДЭ.

Приготовление растворов

Фосфатно-буферный раствор (ФБР) pH 6,0-6,2—для приготовления суспензии исследуемых образцов. Содержимое флакона с сухими компонентами ФБР растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием 30 мин при 0,5 атм, концентрацию водородных ионов pH контролируют на иономере универсальном.

Хлорид железа (III)—для выявления наличия фенилаланиндезаминазы. Содержимое флакона растворяют в 1,8 мл дистиллированной воды.

Парадиметиламинобензальдегид—для обнаружения индолообразования. Для приготовления реактива Эрлиха навеску растворяют в 1,9 мл 96% этилового спирта, а затем добавляют 0,4 мл 33% соляной кислоты.

α -нафтол—для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Содержимое флакона растворяют в 2,38 мл 96% этилового спирта. Готовят ex tempore.

Калия гидроокись—для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Содержимое флакона растворяют в 1,2 мл дистиллированной воды.

Подготовка исследуемых образцов.

Перед проведением исследования выделенная культура подлежит изучению на чистоту и принадлежность к се-

мейству Enterobacteriaceae (рис.3).

Идентификацию культур, выделяемых непосредственно из нативного материала, производят со скошенного мясо-пептонного агара или со среды Олькеницкого. Используют культуры,

выращенные в течение 18-24 ч при температуре 37⁰С, без предварительного подращивания их на мясо-пептонном бульоне.

Если выделенная культура микроорганизма находилась какое-либо

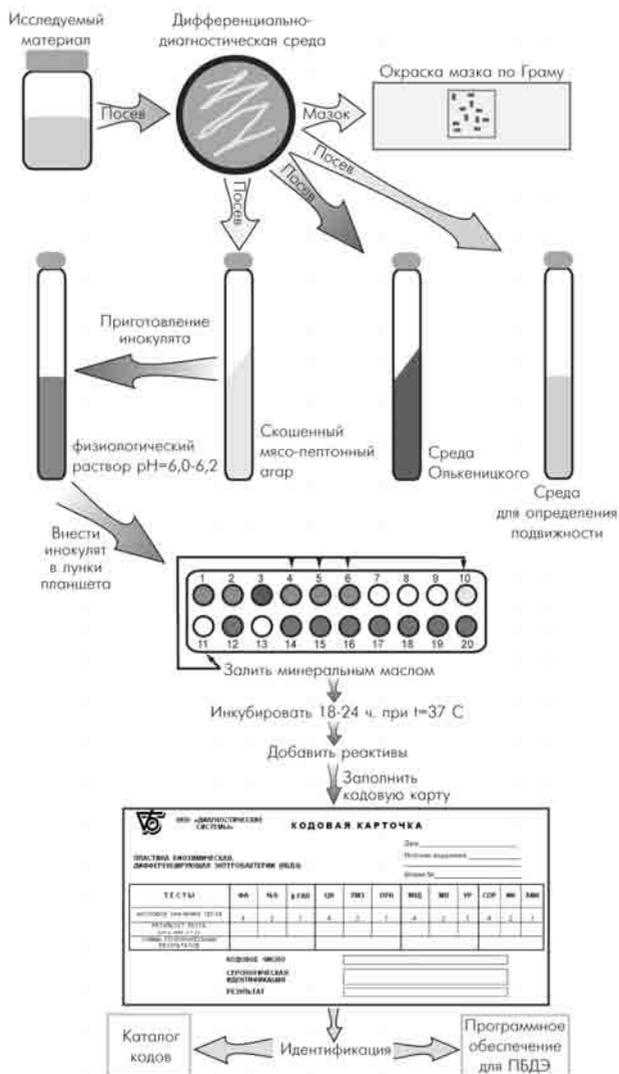


Рис.3. Схема бактериологического исследования с использованием ПБДЭ

время на хранении при комнатной температуре или в холодильнике, производят предварительный посев ее на мясо-пептонный бульон на 2-4 ч при температуре 37°С, затем осуществляют пересев культуры на скошенный мясо-пептонный агар. Посевы инкубируют в течение 18-24 ч при температуре 37°С.

Культуру с мясо-пептонного агара или среды Олькеницкого используют для приготовления суспензии в фосфатно-солевом буферном растворе рН 6,0-6,2 и доводят мутность суспензии до 10 единиц по отраслевому, стандартному образцу мутности бактериальных взвесей, стеклянному. При отсутствии отраслевого, стандартного образца в 4,0 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора вносят исследуемую (2-3 петли) культуру до образования видимой мутности (рис.3).

Проведение исследования

(Рис.3).

1. Вскрывают упаковку.
2. Регистрируют на крышке панели номер засеваемого штамма.
3. Открывают крышку и располагают панель на столе.
4. Добавляют пипеткой по 0,15 мл микробной суспензии во все лунки панели, кроме лунки для обнаружения сероводорода (№ 11), куда вносят только одну каплю (0,05 мл) суспензии.
5. Заливают лунку для обнаружения сероводорода (№ 11) 0,1 мл растопленного и охлажденного до температуры (38-40)°С мясо-пептонного агара, содержащего 0,6% агара микробиологического, и быстро все перемешивают концом раскапывающей пипетки.
6. Для создания анаэробных условий добавляют 1-2 капли стерильного вазелинового масла в лунки для определения лизиндекарбоксилазы (№ 4),

аргининдегидролазы (№ 5), орнитиндекарбоксилазы (№ 6), уреазы (№ 10) и образования сероводорода (№ 11).

7. Закрывают крышку панели.

Выдерживают ПБДЭ в течение 18-24 ч при температуре 37°С

Учет результатов. Учет результатов производят визуально в соответствии с цветовым указателем, приложенным к ПБДЭ, через 18-24 ч инкубации при температуре 37°С, за исключением теста на обнаружение -галактозидазы, который проводят дважды: через 3-5 ч и через 18-24 ч, т.к. у некоторых штаммов лимонно-желтое окрашивание через 18-24 ч исчезает.

Через 18-24 ч инкубации открывают крышку панели и в лунку для выявления фенилаланиндезаминазы (№ 7) добавляют 1 каплю 10%-го раствора хлорида железа (III), в лунку для определения ацетилметилкарбинола (№ 9) 1 каплю 6%-го раствора -нафтола и затем 1 каплю 40%-го раствора гидроксида калия, в лунку для выявления индола (№ 8)—1-3 капли реактива Эрлиха. Реакции учитывают немедленно, выявление ацетилметилкарбинола осуществляют через 15-20 мин после закапывания реактивов.

Идентификацию культур микроорганизмов осуществляют с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий, диагностического "ключа", каталога кодов—пособия для интерпретации результатов идентификации с использованием математического метода классификации.

Форма выпуска. Выпускается в наборе, состоящем из 20 пластин в герметично запаянном пакете, 1 флакона с 0,95 г сухих компонентов ФБР рН 6,0-6,2, 1 флакона с 0,2 г хлорида железа (III), 1 флакона с 0,02 г парадиметиламинобензальдегида, 1 флакона с

Обезвреживание ПБДЭ. Погружением (полным) не менее чем на 60 мин в 3% раствор хлорамина Б или 6% раствор перекиси водорода с 0,5% СМС.

Цветовой указатель

№	Тесты	Цвет среды в растворенном виде	Положительная реакция	Отрицательная
1	Утилизация цитрата натрия	желтый, светло-зеленый	темно-зеленый, синий	желтый, светло-зеленый
2	Утилизация малоната натрия	желтый	темно-зеленый, синий	желтый, светло-зеленый
3	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	желтый, коричневый	фиолетовый, бурый	желтый, коричневый
4	Наличие лизиндекарбоксилазы	желтый, светло-зеленый	темно-зеленый, синий	желтый, светло-зеленый
5	Наличие аргининдегидролазы	желтый, светло-зеленый	темно-зеленый, синий	желтый, светло-зеленый
6	Утилизация орнитиндекарбоксилазы	желтый, светло-зеленый	темно-зеленый, синий	желтый, светло-зеленый
7	Наличие фенилаланиндезаминазы	бесцветный	темно-зеленый	желтый
8	Образование индола	бесцветный	розовый	бесцветный
9	Образование ацетилметилкарбинола	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный
10	Наличие уреазы	желтый	малиновый, красный	желтый
11	Образование сероводорода	бесцветный	черный, темно-серый	желтый
12	Утилизация глюкозы	красный	желтый	красный
13	Наличие β -галактозидазы	бесцветный	лимонно-желтый	бесцветный
14	Утилизация лактозы	красный	желтый	красный
15	Утилизация маннита	красный	желтый	красный
16	Утилизация сахарозы	красный	желтый	красный
17	Утилизация инозита	красный	желтый	красный
18	Утилизация сорбита	красный	желтый	красный
19	Утилизация арабинозы	красный	желтый	красный
20	Утилизация мальтозы	красный	желтый	красный

0,8 г калия гидроксида, 1 флакона с 0,12 г -нафтола, 1 флакона с 8,0 г масла вазелинового, инструкции по применению, диагностического "ключа" и таблицы биохимических свойств энтеробактерий. Набор тест-системы упакован в коробку. По просьбе потребителей к набору прилагается каталог кодов.

Условия хранения и транспортирования.

Транспортирование и хранение препарата в защищенном от света месте при температуре от 2 до 25°С.

Срок годности. 1 год.

7. Способ применения ПБДС.

Приготовление растворов.

1% пептонная вода рН 7,2-7,4—для приготовления суспензии исследуемых образцов. Содержимое флакона с сухими компонентами 1% пептонной воды растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием 30 мин при 1 атм, концентрацию водородных ионов рН контролируют на иономере универсальном.

α-нафтол—для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Содержимое флакона растворяют в 2,38 мл 96 этилового спирта. Готовят их tempore.

Калия гидроокись—для обнаружения образования ацетилметилкарбинола. Содержимое флакона растворяют в 1,2 мл дистиллированной воды.

Реактив Грисса—для выявления нитратредуктазы. Содержимое флакона растворяют в 2,0 мл дистиллированной воды.

Натрия гидроокись—для определения фосфатазы. Содержимое флакона растворяют в 1,6 мл дистиллированной воды.

Подготовка исследуемых образцов.

Перед проведением исследования выделенная культура принадлежит изучению на чистоту и принадлежность к роду *Staphylococcus*.

Идентификацию культур, выделяемых непосредственно из нативного материала, производят со скошенного мясо-пептонного агара. Используют культуры, выращенные в течение 18-24 ч при температуре 37°С, без предварительного подращивания их на мясо-пептонном бульоне (Рис.4).

Если выделенная культура микроорганизма находилась какое-либо время на хранении при комнатной температуре или в холодильнике, производят предварительный посев ее на мясо-пептонный бульон на 2-4 ч при температуре 37°С, затем осуществляют пересев культуры на скошенный мясо-пептонный агар. Посевы инкубируют в течение 18-24 ч при температуре 37°С.

Культуру с мясо-пептонного агара используют для приготовления суспензии в стерильной 1% пептонной воде рН 7,2-7,4 и доводят мутность суспензии до 10 единиц по отраслевому, стандартному образцу мутности бактериальных взвесей, стеклянному. При отсутствии отраслевого, стандартного образца в 4,0 мл стерильной 1% пептонной воды вносят исследуемую 2-3 петли культуру до образования видимой мутности.

Проведение исследования

1. Вскрывают упаковку ПБДС.
2. Регистрируют на крышке панели номер засеваемого штамма.
3. Открывают крышку и располагают панель на столе.
4. Добавляют пипеткой по 0,15 мл микробной суспензии в стерильной 1% пептонной воде рН 7,2-7,4 во все

лунки панели, кроме 17, 18, 19, которые остаются свободными.

5. Для создания анаэробных условий добавляют 1-2 капли стерильного вазелинового масла в лунки для определения аргининдегидролазы и уреазы (№№ 11, 20).

6. Закрывают крышку панели.

Выдерживают ПБДС в течение 18-24 ч при температуре 37°C (Рис.4).

Учет результатов.

Учет результатов производят визуально в соответствии с цветовым указателем, приложенным к ПБДС, через 18-24 ч инкубации при температуре 37°C.

После окончания инкубации открывают крышку панели и в лунки для выявления ацетилметилкарбинола (№ 10) добавляют 1 каплю 6%-го раство-

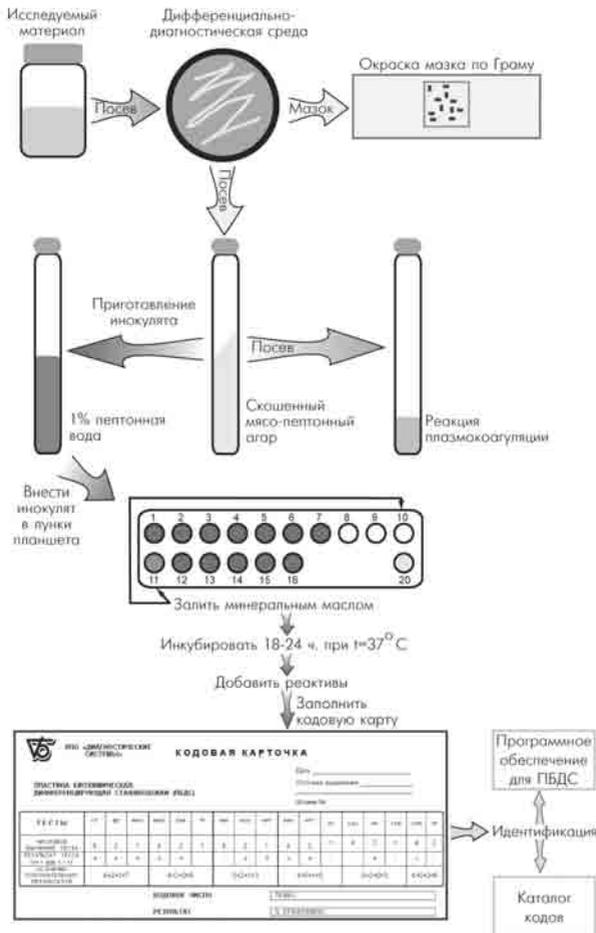


Рис.4. Схема бактериологического исследования с использованием ПБДС

Цветовой указатель

№	Тесты	Цвет среды в растворенном виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	Утилизация глюкозы	красный	желтый	красный
2	Утилизация фруктозы	красный	желтый	красный
3	Утилизация маннозы	красный	желтый, оранжевый	красный
4	Утилизация мальтозы	красный	желтый, оранжевый	красный
5	Утилизация лактозы	красный	желтый	красный
6	Утилизация трегалозы	красный	желтый	красный
7	Утилизация маннита	красный	желтый, оранжевый	красный
8	Наличие фосфатазы	бесцветный	малиновый	бесцветный, слабо-розовый
9	Наличие нитратредуктазы	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный
10	Образование ацетилметилкарбинола	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный
11	Наличие аргининдегидролазы	желтый, зеленый	голубой, синий	желтый, зеленый
12	Утилизация ксилозы	красный	желтый	красный, оранжевый
13	Утилизация сахарозы	красный	желтый	красный
14	Утилизация арабинозы	красный	желтый, оранжевый	красный
15	Утилизация галактозы	красный	желтый, оранжевый	красный
16	Утилизация салицина	красный	желтый, оранжевый	красный
20	Наличие уреазы	желтый	красный, малиновый	желтый

ра α -нафтола и затем 1 каплю 40%-го раствора гидроокиси калия; для определения фосфатазы (№ 8)—1 каплю 20%-го раствора гидроокиси натрия; для выявления нитратредуктазы (№ 9) добавляют 1-2 капли реактива Грисса. Реакции учитывают немедленно в лунках № 8 и 9, выявление ацетилметилкарбинола (лунка № 10) осуществляют через 15-20 мин после закапывания реактивов.

Идентификацию культур микроорганизмов проводят с использованием таблицы биохимических свойств стафилококков, каталога кодов—пособия для интерпретации результатов идентификации с использованием тематического метода классификации.

Обезвреживание ПБДС.

Погружением (полным) не менее чем на 60 мин в 3% раствор хлорамина Б или 6% раствор перекиси водорода с 0,5% СМС.

Форма выпуска.

Выпускается в наборе состоящем из 20 пластин, в герметично запаянном пакете, 1 флакона с 1,85 г сухих компонентов 1% пептонной воды рН 7,2-7,4, 1 флакона по 0,12 г -нафтола, 1 флакона с 0,2 г реактива Грисса, 1 флакона с 0,8 г калия гидроокиси, 1 флакона с 0,4 г натрия гидроокиси, 1 флакона с 8,0 мл вазелинового масла, инструкции по применению и таблицы биохимических свойств стафилококков.

Набор тест-системы упакован в коробку. По просьбе потребителей к набору могут быть дополнительно приложены каталог кодов и кодовые карточки.

Условия хранения и транспортирования.

Транспортирование и хранение препарата в защищенном от света ме-

сте при температуре от 2 до 25°С.

Срок годности. 1 год.

8. Наиболее частые причины ошибок при идентификации бактерий с использованием ПБДЭ и ПБДС.

1. Исследование следует проводить только с чистой культурой, работа с контаминированной культурой может привести к ошибочным результатам.

2. При исследовании музейных штаммов следует провести подготовительные мероприятия с целью "оживления" культуры, для этого необходимо сделать 1-2 пассажа на питательный бульон или агар. Следует использовать среды высокого качества с большим содержанием питательных веществ. У музейных штаммов могут быть обнаружены более низкие уровни энзиматической активности, поэтому следует готовить более плотный инокулят.

3. Для приготовления микробной суспензии фосфатно-солевой раствор и пептонную воду следует использовать только комнатной температуры.

4. Раскапывание микробной суспензии необходимо осуществлять сразу же после ее приготовления. Необходимо четко соблюдать дозу инокулята вносимую в лунки планшета, малое количество может привести к неполному растворению субстрата, что вызовет затруднения при оценке результатов.

5. При постановке теста на образование сероводорода необходимо тщательно перемешать концом раскапывающей пипетки субстрат с инокулятом, для более полного и быстрого растворения субстрата в инокуляте, а затем уже производить дальнейшие требуемые инструкцией манипуляции.

6. При учете результатов на образование индола в лунку необходимо внести не менее 2-3 капель реактива Эрлиха, в противном случае можно получить слабоположительные результаты.

7. Учет результатов в тесте на наличие фосфатазы следует производить немедленно после закапывания реактивов, т.к. ярко-розовое окрашивание быстро исчезает.

9.Каталог кодов и принцип работы с ним.

Обычно идентификацию микроорганизмов до видового ранга проводят с помощью таблиц биохимических свойств бактерий, описанных в руководствах и определителях микробов, путем сравнения полученных результатов тестирования с данными, представленными в таблицах.

Для освобождения бактериолога от подобной утомительной работы по сравнительному анализу тестирования предложены дихотомические ключи (возможна идентификация при типичном поведении штамма).

К зарубежным коммерческим тест—системам (API, MICRO-ID) и к отечественным ПБДЭ, ПБДС разработаны каталоги кодов (Соколова К.Я., Власенко М.А., Лихачева А.Ю., 1992).

При конструировании каталога кодов составлялась база данных, включающая описание по 20 биохимическим признакам и тесту подвижности 19 родов, 53 видов представителей семейства Enterobacteriaceae и база данных, включающая 21 наименование (19 видов и 2 подвида) представителей рода Staphylococcus и данные по 17 биохимическим тестам и тесту плазмокоагуляции. База данных содержала информацию о частоте положительных и отрицательных значений

тестов для каждого вида, согласно "Руководству по определению микроорганизмов Берги" (1984).

Учет результатов биохимического тестирования проводят с использованием кодовой карточки. Схемы 5, 6.

В кодовой карточке тесты разделены на 7 групп (6) -(по 3 теста в каждой группе) и для каждого теста дано цифровое значение (4,2,1). При заполнении кодовой карточки результат теста в случае положительной реакции обозначается цифрой 4,2,1, как указание для данного теста, а при отрицательной реакции цифровое значение любого теста равно нулю. Цифровые значения тестов в каждом триplete суммируются, после чего выводится кодовое число исследуемого организма. По каталогу кодов в соответствии с кодовым числом проводят определение микроорганизмов. Коды в каталоге расположены в порядке возрастания их числовых значений.

Информация в каталоге кодов располагается в 4 графах: 1 графа—кодовое число микроорганизма, 2—видовое название, 3—абсолютная вероятность видовой идентификации, 4- относительная вероятность видовой идентификации (при совпадении кодовых чисел).

Если выделенная культура имеет кодовое число, не представленное в каталоге кодов, то исследуемый штамм должен рассматриваться как не идентифицированный. Самое близкое цифровое значение кодового числа не является пригодным для идентификации. Штамм подлежит повторному изучению на чистоту и принадлежность к семейству, или роду (рассев на пластинчатые среды, микроскопия мазка, окрашенного по Граму, проверка на наличие оксидазы, подвижности, каталазы, серологическая идентификация).

Если кодовое число идентифицированной культуры соответствует одновременно нескольким видам, то за результат идентификации выбирают вид, обладающий наибольшим значением показателя относительной вероятности, указанной в каталоге. Значение показателей абсолютной и относительной вероятности представлены в нормализованном виде (в величинах от 0 до 1).

Каталог кодов может быть использован для оценки результатов идентификации, полученных не только с помощью ПБДЭ, ПБДС, но и с помощью традиционных дифференциально—диагностических сред. В этом случае набор и последовательность тестов должны соответствовать кодовой карточке, так как изменение порядка расположения тестов повлечет за собой изменение кодового числа и неверную идентификацию.

10. Программное обеспечение для ПБДЭ, ПБДС к персональным компьютерам.

При переходе от классических к современным методам исследования большое значение приобретает унификация самой процедуры их выполнения. Важную роль в этом процессе играют стандартизация методов, ускорение проведения анализов, улучшение воспроизводимости результатов, миниатюризация приборов, механизация и автоматизация различных этапов исследования.

Для создания автоматизированного рабочего места микробиолога и дальнейшей унификации этапа интерпретации результатов разработано программное обеспечение, предназначенное для персональных компьютеров. База данных аналогична ис-

пользуемой при составлении каталога кодов. Дискета помещается в дискетный привод компьютера, и запускается программа, после чего на экране дисплея появляется таблица (схемы 5,6). В таблицу вносится дата проведения исследования, источник выделения и номер штамма. Затем вводятся результаты тестов, полученные с помощью ПБДЭ, ПБДС. После обработки введенных данных выводится результат идентификации. При наличии принтера результаты могут быть получены в печатном виде.

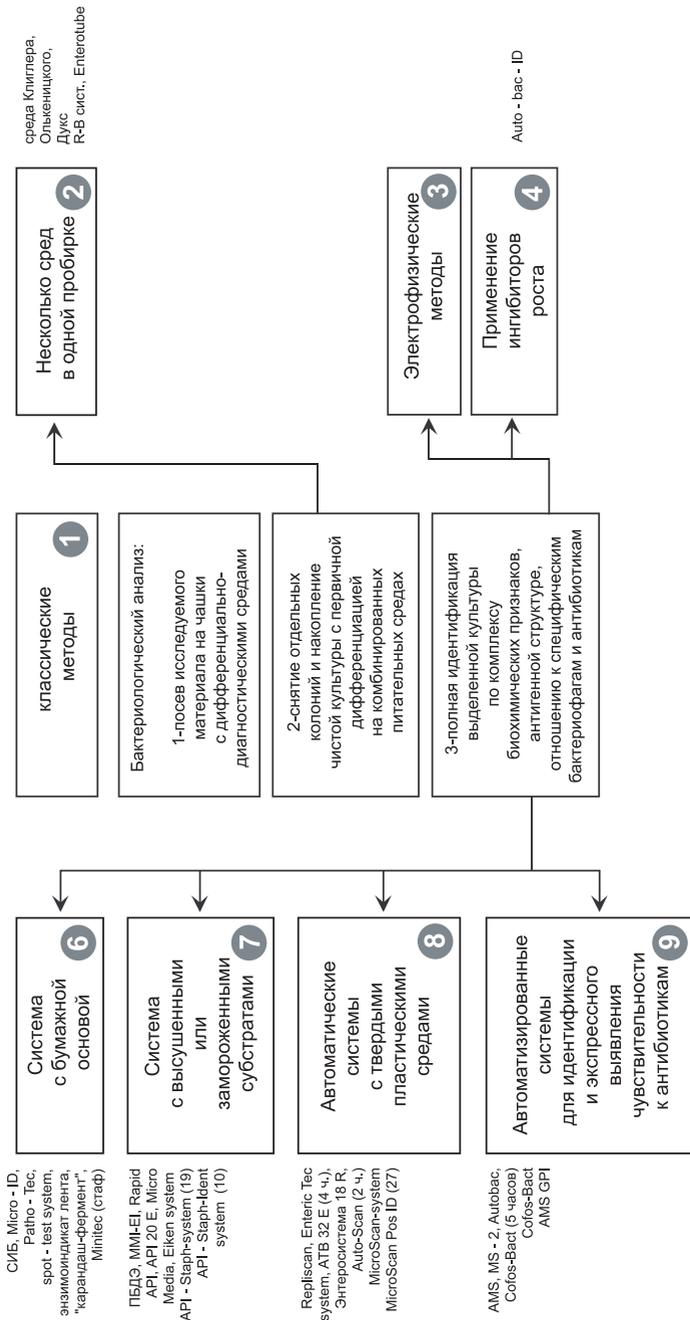
Если выделенная культура обладает свойствами, не представленными в базе данных (или была допущена ошибка при наборе значения тестов), то на экране дисплея возникает надпись: "Проверьте правильность набора тестов". Штамм подлежит повторному изучению на чистоту и принадлежность к семейству, или роду (рассев на пластинчатые среды, микроскопия мазка, окрашенного по Граму, проверка на наличие оксидазы, подвижности, каталазы и утилизацию глюкозы (анаэробные условия).

Использование каталога кодов и программного обеспечения позволяет сделать этап интерпретации результатов тестирования независимым от опыта и уровня профессиональной подготовки микробиолога.

Литература.

1. Блохина И.Н., Ладыгина Г.Н., Соколова К.Я., Залесских Н.В., Коро-венков А.В. Методы идентификации бактерий.- Учебное пособие/ ГГУ, Горький, 1986,с.5-7.
2. Блохина И.Н., Беляев Е.И., Бруснигина Н.Ф., Власенко М.А., За-лесских Н.В., Лихачева А.Ю., Соколова К.Я., Усачева С.Ю. Организация бакте-риологического контроля за раневой инфекцией в экстремальных условиях. Методические рекомендации. Горь-кий, 1989.
3. Власенко М.А., Денисенко Т.Л. Разработка тест-системы для иденти-фикации стафилококков и ее сравне-ния с традиционным методом. // Но-вое в практике лабораторных иссле-дований инфекционных заболеваний.- Н.Новгород, 1991.- с. 20-25.
4. Залесских Н.В. Усовершенство-вание методов идентификации энтеробактерий с помощью систем индикаторных бумажных (СИБ). Авто-реф. дисс. канд. мед. наук.- Горький, 1985. -с.25-27.
5. Киселева Б.С., Голубева И.В. Методы бактериологического иссле-дования в клинической микробиоло-гии. Методические рекомендации МО-НИКИ им. Владимирского. Москва, 1983.
6. Лавровская В.М., Соколова К.Я., Залесских Н.В., Дратвин С.А., Ан-дреева З.М., Шобухова Т.С. Методиче-ские рекомендации по применению систем индикаторных бумажных (СИБ) для идентификации энтеробактерий. Москва, 1989, с.1-4.
7. Определитель бактерий Бер-джи.- Москва., 1997.
8. Скала Л.В., Нехорошева А.Е., Винокуров А.Е., Лукин И.Н., //Клиниче-ская лабораторная диагности-ка.-2001.-№12.
9. Соколова К.Я. Экспресс мето-ды энзимоидентификации микроорга-низмов (на модели энтеробактерий). Автореф. дисс. докт.мед. наук.- Киев, 1990- с.1-3, 28-30.
10. Gilbert D.N. // Int. J. Syst. Bacte-riol. - 1998.
11. McClure P.J. et al. //J. Industr. Microbiol. - 1993. - Vol. 12.

Усовершенствование биохимической идентификации представителей семейства энтеробактерий и рода стафилококков



Ключ для идентификации энтеробактерий по 9 тестам

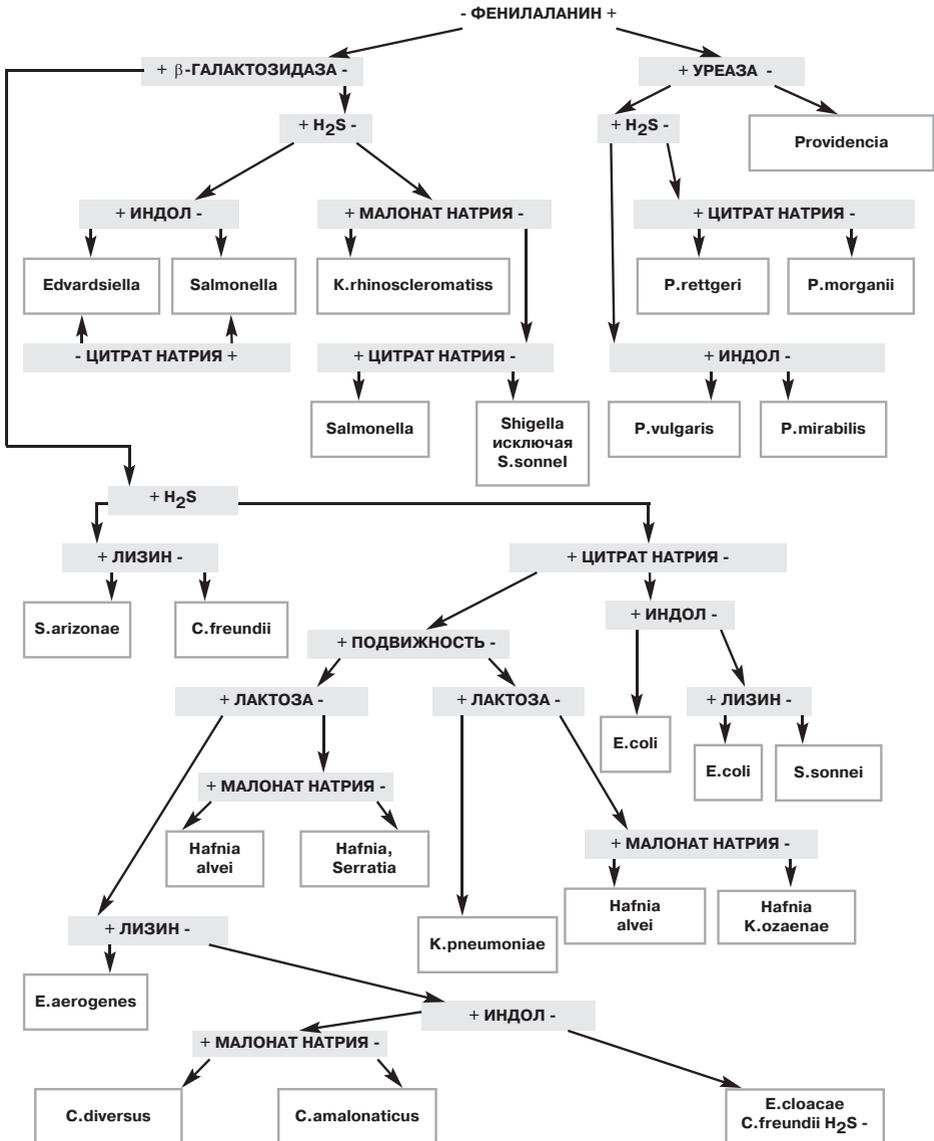


СХЕМА 5

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»																					
КОДОВАЯ КАРТОЧКА																					
Пластина биохимическая дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ)												Дата _____ Источник выделения _____ Штамм № _____									
ТЕСТЫ	ЦН	МН	ЦНГ	ЛИЗ	АРГ	ОРН	ФА	ИНД	АМК	УР	H ₂ S	ГЛ	β-ГАЛ	ЛАК	МТ	САХ	ИН	СОР	АР	МАЛ	ПОДВ
Числовые значения теста	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Результат теста («+» или «-»)																					
Сумма положительных результатов	1		4			2			1			4+2+1=7			4+1=5			4+2+1=7			
Кодовое число	1421757																				
Серологическая Идентификация																					
Результат	Escherichia coli																				

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»																					
КОДОВАЯ КАРТОЧКА																					
Пластина биохимическая дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ)												Дата _____ Источник выделения _____ Штамм № _____									
ТЕСТЫ	ЦН	МН	ЦНГ	ЛИЗ	АРГ	ОРН	ФА	ИНД	АМК	УР	H ₂ S	ГЛ	β-ГАЛ	ЛАК	МТ	САХ	ИН	СОР	АР	МАЛ	ПОДВ
Числовые значения теста	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Результат теста («+» или «-»)	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Сумма положительных результатов	1		4			2			1			4+2+1=7			4+1=5			4+2+1=7			
Кодовое число	1421757																				
Серологическая Идентификация																					
Результат	Escherichia coli																				

СХЕМА 6

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»																		
КОДОВАЯ КАРТОЧКА																		
Пластина биохимическая дифференцирующая стафилококки (ПБДС)												Дата _____ Источник выделения _____ Штамм № _____						
ТЕСТЫ	ГЛ	ФР	МНЗ	МАЛ	ЛАК	ТР	МН	ФОС	НИТ	АМК	АРГ	КС	САХ	АР	ГАЛ	САЛ	УР	ПЛ
Числовые значения теста	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Результат теста («+» или «-»)																		
Сумма положительных результатов																		
Кодовое число																		
Результат																		

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»																		
КОДОВАЯ КАРТОЧКА																		
Пластина биохимическая дифференцирующая стафилококки (ПБДС)												Дата _____ Источник выделения _____ Штамм № _____						
ТЕСТЫ	ГЛ	ФР	МНЗ	МАЛ	ЛАК	ТР	МН	ФОС	НИТ	АМК	АРГ	КС	САХ	АР	ГАЛ	САЛ	УР	ПЛ
Числовые значения теста	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Результат теста («+» или «-»)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Сумма положительных результатов	4+2+1=7		4+2=6			2+1=3			4+2=6			4+1=5			2			
Кодовое число	763652																	
Результат	S. epidermidis																	

ООО “НПО “Диагностические системы” на сегодняшний день является одним из крупнейших производителей иммунобиологических препаратов на территории России и СНГ. В трех основных отделах компании - научном, производственном и по реализации лекарственных средств и изделий медицинского назначения - трудятся более 300 квалифицированных специалистов, большинство из которых имеют медицинское и биологическое образование. В числе сотрудников предприятия - 4 доктора и 18 кандидатов медицинских и биологических наук.

Основные направления деятельности.

◇ разработка и производство иммуноферментных тест-систем для диагностики вирусных гепатитов А, В, С, D, ВИЧ-инфекции, сифилиса, хламидиоза, тест-систем для идентификации энтеробактерий и стафилококков, диагностических наборов для оценки активности аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы;

◇ обучение специалистов методам иммуноферментной диагностики и работе с тест-системами на базе учебно-консультативного центра ООО НПО "Диагностические системы".



Нижний Новгород

Главный офис:

ООО «НПО «Диагностические системы»
603093, г. Нижний Новгород,
ул. Яблоневая, д. 22
тел. (831) 434-86-83
info@npods.nnov.ru

Департамент продаж:

ул. Нижне-Волжская набережная, д. 9
тел. (831) 467-82-02
тел/факс (831) 467-82-15, 467-82-16, 467-82-17
selling@npods.ru
www.npods.ru

Региональные предприятия

Москва	ООО "Диагностические системы—Столица" 117405, г. Москва, ул. Дорожная, д. 60 Б тел. (495) 411-96-84, 411-96-85, 411-96-86 e-mail: ds-stolica@bk.ru zav2006@bk.ru
Санкт-Петербург	ООО "Диагностические системы—СПб" 194044, г. Санкт-Петербург, пр. Большой Сампсониевский, д. 66, Литер А тел/ факс (812) 702-17-13, 702-17-14 spb@npods.ru managerspb@npods.ru
Красноярск	ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел/ факс (3912) 54-16-55, 54-14-66, 54-17-58 ds-siberia@scn.ru
Республика Украина	ООО "Диагностические системы—Украина" 04210, г. Киев, а/я 119 тел. (10-380-44) 501-90-80, тел/факс 501-91-00 ua@npods.ru
Республика Казахстан	ТОО "Диагностические системы—Казахстан" тел. +7-777 265-60-00 тел.\факс +7-727-296-72-37 kz@npods.ru
Республика Узбекистан	ООО "Диагностические системы—Бактрия" г. Ташкент, 1 тупик Муками, д.7, офис 312 тел/факс +99-871 157-20-77, 704-06-30, 704-06-40 ds-baktriya@mail.ru
Ростов-на-Дону	Обособленное подразделение 344068, г. Ростов-на-Дону пр. М.Нагибина, д. 33 а/47, 3 этаж, офис 5 тел/факс (863) 292-41-01, моб. 8-8632-75-66-22 RostovDon@npods.ru
Чита	Обособленное подразделение 672000, г. Чита, ул. 9 января, д. 6, офис 103 тел. (3022) 35-27-91, chitanpods@mail.ru