

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН

«Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии»



И.А. Дятлов

02 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая»

(дата утверждения 30.07.2012 г., дата актуализации 01.02.2017 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая» (далее - Питательная среда) предназначена для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом при проведении бактериологических исследований в клинической лабораторной диагностике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Питательная среда представляет собой смесь сухих компонентов в виде мелкодисперсного, гигроскопичного порошка желтоватого цвета.

Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

2.1. Принцип действия

Определение основано на образовании зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами чувствительными микроорганизмами и последующей регистрацией диаметров этих зон.

2.2. Состав, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки	21,0
Пептон сухой ферментативный	10,0
Натрий хлористый	3,0
Крахмал растворимый, индикатор	1,5
Агар микробиологический	12,0±3,0

pH 7,2-7,6

Определение pH проводят потенциометрическим методом с применением стеклянного электрода в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» в экстракте, приготовленном путем добавления к 2,00 г сухой питательной среды 100 мл дистиллированной воды, настаивания с периодическим перемешиванием в течение 1 ч при температуре 18 - 25 °С и последующего фильтрования через бумажный фильтр.

Величина pH, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению pH готовой среды и может незначительно меняться после стерилизации. Пределы значения pH, указанные выше, учитывают отклонения pH после стерилизации среды.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Питательная среда обеспечивает рост тест-штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 в виде однородного не очень плотного газона с образованием четких соответствующего диаметра зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами (см. таблицу) через 18-20 ч инкубации посевов при температуре (36±1) °С в соответствии с таблицей.

Таблица - Допустимые диапазоны значений диаметров зон задержки роста тест-штаммов микроорганизмов.

№ п/п	Антибактериальные препараты (АБП)	Содержание АБП в диске	Диаметры зон задержки роста, мм		
			<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	Бензилпенициллин	10ед	29-38	*)	-
2	Карбенициллин	100 мкг	35-42	23-29	18-25
3	Стрептомицин	30 мкг	20-25	14-22	-
4	Неомицин	30 мкг	20-27	17-22	-
5	Гентамицин	10 мкг	22-32	20-27	16-26
6	Тетрациклин	30 мкг	22-31	17-26	-
7	Эритромицин	15 мкг	22-31	8-15	-
8	Левомецетин	30 мкг	19-25	19-27	-
9	Полимиксин	300 ед	-	16-20	16-20

*) – определение с данными АБП не производят

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

«Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая» относится к медицинским изделиям с низким индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья – класс 1.

При работе с музейными и выделенными штаммами микроорганизмов необходимо соблюдение СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат, обеспечивающий температуру 35-37 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Диски с антибактериальными препаратами
- Пинцеты анатомические
- Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО 42-28-85 П) 10 единиц соответствующего года выпуска

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Выделенные из клинического материала чистые культуры микроорганизмов.

Работу с материалом, его хранение, обезвреживание и исследования проводят в соответствии с МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование проводят в условиях бактериологической лаборатории медицинскими специалистами, имеющие разрешение на работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

7.1. Приготовление среды

Питательная среда в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, тщательно размешивают в 1л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара, разливают по колбам и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. После охлаждения до 45-50°C среду разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм и по 25 мл среды в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, устанавливая их на строго горизонтальную гладкую поверхность (выверенную по уровню). Соблюдение указанных предосторожностей связано с тем, что зоны задержки роста зависят от толщины и однородности агарового слоя. При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсу-

шить, соблюдая правила асептики, при температуре $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ с приоткрытой крышкой в течение 10-20 мин. Готовая среда в чашках прозрачная желтого цвета.

Готовую среду в чашках можно хранить в запаянных полиэтиленовых пакетах при $4-8^{\circ}\text{C}$ в течение 7-10 сут.

После каждого вскрытия и проведения необходимых исследований банку со средой плотно закрыть и поместить на дальнейшее хранение при температуре $2-30^{\circ}\text{C}$.

7.2 Исследование образца

7.2.1 Приготовление инокулята.

Выделенную культуру микроорганизма бактериологической петлей переносят в пробирки со стерильным 0,9% раствором натрия хлористого и доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по ОСО 42-28-85 П, соответствующего года выпуска. Стандартную микробную взвесь готовят путем десятикратного разведения (9,0 мл 0,9 % раствора натрия хлористого с 1,0 мл микробной взвеси) до разведения 10^{-1} . В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят новой стерильной пипеткой вместимостью 1мл.

7.2.2 Инокуляция чашек Петри со средой

Для инокуляции приготовленных чашек со средой 1,5-2,0 мл стандартной взвеси наносят на поверхность чашки Петри со средой и равномерно распределяют путем покачивания чашек. Избыток микробной взвеси удаляют стерильной пипеткой. Затем чашки подсушивают, приоткрыв крышки, при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

7.2.3 Аппликация дисков и инкубация.

Не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибактериальными препаратами (АБП). Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. На одну чашку диаметром 90 мм помещают 4 диска с АБП, аккуратно прижав их пинцетом к поверхности среды. Чашки помещают в термостат сразу после наложения дисков и инкубируют при температуре $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 ч. Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации приводит к увеличению диаметра зоны подавления роста.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

После окончания инкубации чашки помещают вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). С помощью штангенциркуля или специальной линейки измеряют диаметры зон задержки роста с точностью до 1 мм. Интерпретацию полученных результатов проводят в соответствии с МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Серии питательной среды, пришедшие в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы, любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Уничтожение питательной среды после проведения биологического контроля осуществляется по СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре $(126 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Обращение с медицинскими отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации, осуществляющей медицинскую и (или) фармацевтическую деятельность. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ

Питательную среду необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °C и относительной влажности не более 60 %. После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30 °C, избегая попадания влаги.

Питательную среду транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

Изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая» заявленным в ТУ 9398-030-78095326-2007 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности и при соблюдении условий хранения и транспортирования.

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

По вопросам, касающимся качества «Питательной среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам сухой», получения консультации и поддержки следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.

Зам. директора
по научно-производственной работе



А.П. Шепелин

Пронумеровано, прошнуровано,
скреплено подписью и печатью
5 (пять)
листов. Подпись [подпись]
"01" 02

