

**УТВЕРЖДАЮ****Директор ФБУН «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и
биотехнологии»**

И.А. Дятлов

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ**по применению медицинского изделия****«Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению
(Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021****1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Медицинское изделие «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021 предназначено для проведения бактериологических исследований с целью количественного определения бифидобактерий в клиническом материале человека, а также для использования в качестве вспомогательного средства диагностики нарушений микробиоты кишечника (дисбактериоза) совместно с результатами других лабораторных исследований и клинической картиной пациента, далее по тексту – среда Блаурокка.

Область применения среды Блаурокка – клиническая лабораторная диагностика.

Функциональное назначение

Медицинское изделие «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021 может быть использовано для проведения бактериологических исследований образцов фекалий:

- при острых кишечных инфекциях (острая дизентерия, сальмонеллез, эшерихиоз, вирусные диареи) в случаях развития выраженных явлений дисбактериоза;
- при хронических воспалительных заболеваниях тонкого и толстого кишечника (хронические энтероколиты и колиты, в том числе неспецифический язвенный колит), протекающий на фоне глубоких нарушений микрофлоры с дефицитом или отсутствием бифидофлоры;
- при длительной кишечной дисфункции неустановленной этиологии;

- при кишечных дисфункциях на фоне дисбактериоза кишечника, возникшего как следствие длительной антибактериальной терапии, гормонотерапии и др.

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования на дисбактериоз и количественного определения бифидобактерий определения служат нативные фекалии без консерванта.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Среда Блаурокка представляет собой готовую к применению стерильную питательную среду для выявления бифидобактерий, разлитую в бутылки объемом 250 см³ по 0,20 л или в бутылки объемом 450 см³ по 0,40 л среды и простерилизованную автоклавированием при температуре 110 °С (0,5 ати) в течение 30 мин.

Среда Блаурокка в бутылках представляет собой жидкость коричневого цвета. Допускается небольшая опалесценция.

2.1. Принцип метода

Совокупность компонентов, входящих в состав питательной среды, обеспечивает питательные потребности для роста бифидобактерий. Печеночный перевар и пептон ферментативный обеспечивают белковое питание бифидобактерий, лактоза является ферментируемым углеводом и источником энергии. L-цистин – это аминокислота, необходимая для размножения бактерий. Она действует как восстановитель, снижая окислительно-восстановительный потенциал, способствуя росту анаэробов, к которым относятся бифидобактерии. Вязкая консистенция и высокий столбик среды, разлитой в пробирки, помогают поддерживать низкий окислительно-восстановительный потенциал. Небольшое количество (0,9 %) агара формирует среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними.

Принцип количественного определения бифидобактерий основан на регистрации максимального разведения клинического образца, из которого при посеве в среду Блаурокка визуально отмечается рост в виде помутнения или колоний в виде «комет», «гвоздиков», «тяжей», «зерен», при обязательном обнаружении типичных клеток бифидобактерий в мазках, окрашенных по Граму, и на вычислении количества живых бактерий в 1 г клинического образца с учетом кратности разведения.

2.2. СОСТАВ

Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка) готовится из следующих компонентов:

Печеночный перевар 1,0 л

Пептон сухой ферментативный	10,0 г
Натрий хлористый	5,0 г
Лактоза	10,0 г
L – цистин	0,1 г
Агар бактериологический	0,9 г

рН готовой среды от 6,3 до 7,1

Определение рН среды Блаурокка проводят непосредственно в готовой среде Блаурокка потенциометрическим методом с применением стеклянного электрода в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфическая активность.

Специфическая активность среды Блаурокка оценивается по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств контрольных тест-штаммов бифидобактерий при росте на среде Блаурокка, приготовленной по п. 7.2 настоящей Инструкции.

Среда Блаурокка обеспечивает визуально обнаруживаемый рост тест-штаммов *Bifidobacterium breve* ATCC 15701, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15705, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702, *Bifidobacterium longum* ATCC 15708, *Bifidobacterium bifidum* 1 в виде «комет», «гвоздиков», «тяжей», «зерен» различной степени четкости при посеве по 1,0 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-7} в пробирку со средой Блаурокка не позднее 48 ч инкубации посевов при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Диагностическая чувствительность (ДЧ) культуральных исследований образцов с применением испытуемого медицинского изделия составила 100 % (по 10 положительных результатов, полученных двумя независимыми испытателями в двух повторностях на испытуемой среде из 10 исследованных «заведомо положительных образцов», таким образом в сумме 40 положительных из 40).

Для оценки статистической достоверности результатов испытаний, в соответствии с приложением В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий» (Москва, 2018), определена **нижняя граница истинной величины чувствительности культуральных исследований образцов с применением испытуемого медицинского изделия - не менее 94,5% при доверительной вероятности 90% .**

Диагностическая специфичность (ДС) культуральных исследований образцов с применением испытуемого медицинского изделия составила 100 % (по 11 «заведомо отрицательных образцов», полученных двумя независимым испытателями, всего в сумме 44 отрицательных из 44).

Для оценки статистической достоверности результатов испытаний, в соответствии с *приложением В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий» (Москва, 2018)*, определена нижняя граница истинной величины специфичности культуральных исследований образцов с применением испытуемого медицинского изделия - не менее 95% при доверительной вероятности 90%..

Диагностическая эффективность культурального исследования с применением испытуемого медицинского изделия составила 100 % (84 правильных результатов теста из 84 исследованных заведомо отрицательных и положительных образцов), полученных в сумме двумя независимыми испытателями.

Прогностичность положительного результата культурального исследования - 100% (ложноположительных результатов нет), прогностичность отрицательного результата культурального исследования 100% (ложноотрицательных результатов нет) при условии нагруженности образцов не менее 10^5 м.кл./мл (положительные) и при нагруженности образцов не более 10^4 м.кл./мл. (отрицательные).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения среды Блаурокка в соответствии с Приказом МЗ РФ № 4н от 06.6.2012 – класс 2 б.

4.2 Среда Блаурокка не содержит пожароопасных и взрывоопасных веществ. Во время работы необходимо использовать индивидуальные средства защиты органов дыхания и рук по ГОСТ 12.4.011-89.

4.3 Все образцы исследуемого материала *потенциально* содержат микроорганизмы, являющиеся возбудителями инфекций, поэтому при работе необходимо соблюдать требования правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

4.4 Уничтожение среды Блаурокка после проведения биологического исследования образцов осуществляется по СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям; эксплуатации производственных, общественных помещений,

организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий". как уничтожение медицинских отходов, принадлежащих к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 60 мин при температуре $(126 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

4.5 При использовании среды Блаурокка по назначению и в соответствии с инструкцией противопоказаний к применению нет.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- весы лабораторные 2 класса точности;
- термостат, обеспечивающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- водяная баня, работающая в режиме кипения;
- пробирки с пробками стерильные для розлива среды Блаурокка и приготовления ряда десятичных разведений;
- пипетки стерильные, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5; 1,0; 4,5 и 9 мл;
- физиологический раствор (0,85 % раствор натрия хлорида, NaCl), стерильный;
- пипетки Пастера стерильные;
- лопаточки или шпатели стерильные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Диагноз дисбактериоза кишечника основывается на результатах клинического обследования пациента и данных микробиологического исследования фекалий.

6.1 Лабораторная диагностика дисбиотических нарушений кишечника основана на микробиологическом изучении качественного и количественного состава его микробиоты с использованием питательных сред. Основными представителями нормальной микробиоты здоровых людей являются облигатные анаэробы, среди которых особую роль выполняют бифидобактерии, которые участвуют в нормализации процессов всасывания и гидролиза жиров, белкового и минерального обмена, поддержании неспецифической резистентности организма. Бифидобактерии в кишечнике, наряду с лактобактериями обеспечивают колониальную резистентность биотопа, выделяют бактериоцины, препятствуют колонизации патогенных микроорганизмов и размножение условно-патогенных, а их дефицит является одним из патогенетических факторов длительных кишечных дисфункций у детей и взрослых.

Бифидобактерии – грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные бактерии. В кишечнике человека, в основном, присутствуют представители *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*.

Дисбиотические заболевания кишечника могут выражаться снижением содержания бифидобактерий и лактобактерий, нарастании количества кишечных палочек с измененными свойствами. Снижение числа анаэробных представителей облигатной флоры, обладающих высокой антагонистической активностью, создает условия для развития условно-патогенных микроорганизмов.

6.2 Показаниями к применению бактериологического метода исследования клинического материала на дисбактериоз являются диарея; длительное восстановление после кишечных инфекций; длительно протекающие кишечные расстройства, при которых не удаётся выделить патогенные микроорганизмы; дисфункция кишечника у пациентов, которые подвергались длительному воздействию радиации или химических веществ; интенсивная антибиотикотерапия и/или иммунодепрессивная терапия, гормональная терапия, химиотерапия; гнойно-воспалительные очаги, трудно поддающиеся лечению; аллергические заболевания; дерматологическая патология (экзема, дерматиты); железодефицитная анемия, особенно у детей грудного возраста; заболевания, связанные с нарушением водно-солевого, холестеринового обмена.

Противопоказания к использованию метода отсутствуют.

6.3 Биологическим материалом для исследования на дисбактериоз и количественного определения бифидобактерий определения служат **нативные фекалии без консерванта.**

6.4 Сбор материала для исследования

Взятие исследуемого материала проводится в соответствии с требованиями методических указаний «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (МУ 4.2.2039-05); а также методических рекомендаций «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» 14 апреля 1986 г.; отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» Приложение к Приказу Минздрава РФ от 09.06.2003 № 231 (ОСТ 9150.11.0004-2003); методических рекомендаций «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника», РАМН, 2007 г.

Техника взятия исследуемого материала не отличается от техники, применяемой при кишечных инфекциях. Общим требованием к процедуре отбора проб клинического материала является обеспечение условий, исключающих контаминацию (загрязнение) материала. Емкости для сбора образцов должны быть стерильными или тщательно вымыты и лишены следов дезинфицирующих средств.

За 3 - 4 дня до исследования отменяют приём слабительных препаратов и применение ректальных свечей. Использование клизмы при сборе кала не допускается! По возможности сбор материала на исследование должен осуществляться до назначения антибиотиков (если невозможно, то не ранее, чем через 12 часов после отмены препарата).

Кал в количестве не менее 1 г собирают сразу после естественного акта дефекации из судна, горшка (тщательно вымытого и не содержащего следов дезинфектантов) или с пеленки с помощью стерильной стеклянной палочки, проволочной петли или деревянного шпателя и помещают в стерильную посуду (контейнер).

Материал доставляют в лабораторию в течение 3 часов с момента сбора анализа. Допускается доставка материала в лабораторию в течение 24 часов при условии хранения в холоде (для этого можно использовать термоконтейнер с возможностью поддерживать температуру 2-8 °С, хладопакет или обложить контейнер с пробой кубиками льда, приготовленными заранее). Замораживание не допускается!

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение анализа осуществляют в соответствии с требованиями методических рекомендаций «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (1986 г.), методических рекомендаций «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника», РАМН, 2007 г., регламентирующих проведение анализа с использованием среды Блаурокка и описанием характера изменений в составе микробиоты кишечника в зависимости от степени микробиологических нарушений.

Для проведения анализа стерильной одноразовой лопаткой отбирают 1 г нативных фекалий из доставленного в лабораторию клинического образца, переносят в стерильную емкость и гомогенизируют с 9 мл физиологического раствора, получая основное разведение материала 10^{-1} . Из основного разведения делают ряд последующих десятикратных разведений в физиологическом растворе до 10^{-10} и производят высеивание на среду Блаурокка, приготовленную по п. 7.2, из разведений 10^{-5} - 10^{-10} .

Исследование проводят в условиях бактериологической лаборатории медицинскими специалистами (например, врач клинической лабораторной диагностики, врач-бактериолог, врач - медицинский микробиолог, врач-лаборант, иной специалист, ознакомленный с требованиями настоящей Инструкции по применению).

7.2 Подготовка среды Блаурокка к проведению анализа

В день проведения анализа бутылку со средой Блаурокка хорошо перемешивают, осторожно вскрывают, в асептических условиях разливают среду по 9 мл в стерильные

пробирки и закрывают стерильными пробками. Отбирают необходимое для анализа количество пробирок со средой, прогревают (регенерируют) их в кипящей водяной бане в течение 10-15 мин с целью удаления кислорода и охлаждают до комнатной температуры. Оставшиеся пробирки с не регенерированной средой до использования хранят в холодильнике при температуре 2-8 °С не более 7 дней (в день использования – регенерировать!).

Повторное прогревание пробирок со средой не допускается!

7.3. Посев.

Из каждого разведения (10^{-5} - 10^{-10}) анализируемого образца, приготовленного по п. 7.1, по 1 мл переносят пипеткой в пробирки со средой Блаурокка, производя посев со дна до середины столбика среды, аккуратно перемешивают, не допуская пробулькивания и попадания кислорода в среду. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Через 48 ч инкубирования готовят мазки с окраской по Граму, начиная с последней пробирки, где имеется микробный рост. Следует отметить, что при посеве клинического материала не всегда можно увидеть типичный рост бифидобактерий из-за присутствия других микроорганизмов: даже в последних пробирках наблюдается диффузный рост с зонами уплотнений (сгустками).

Для приготовления мазков с окраской по Граму отбирают характерные колонии бифидобактерий пастеровской пипеткой, а в случае помутнения среды производят забор среды со дна пробирки. При просмотре мазков учитывают разведение исследуемого образца, в котором выявляются грамположительные палочки слегка изогнутые, с разветвлением на одном или двух концах, расположенные в виде буквы V, гантелевидной формы, булавовидными утолщениями или в виде скоплений, напоминающих китайские иероглифы.

При оценке результатов необходимо помнить, что используемая для посева среда Блаурокка представляет собой обогащенный субстрат и не является селективной средой для бифидобактерий.

Максимальное разведение, в котором обнаружены типичные клетки бифидобактерий, используют для расчета количества бифидобактерий в 1 г исследуемого образца по формуле:

$$N = \frac{M \times C}{n},$$

где:

N – количество бифидобактерий в 1 г фекалий;

М – количество типичных колоний бифидобактерий (в случае диффузного роста принимается за 1);

С – кратность разведения навески образца фекалий;

n – количество инокулята, внесенное в питательную среду, мл.

Пример: при посеве по 1 мл инокулята в 9 мл среды Блаурокка последнее разведение, в котором наблюдался рост 7 типичных колоний в виде «комет» – 10^9 . В мазке по Граму обнаружены типичные для бифидобактерий клетки. Количество бифидобактерий в 1 г фекалий составило $\frac{7 \times 10^9}{1} = 7 \times 10^9$.

Интерпретацию проводят путем сравнения полученных данных с нормативными значениями, присущими различным возрастным группам, и регистрации степени микробиологических нарушений микробиоты кишечника в соответствии положениями отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» Приложение к Приказу Минздрава РФ от 09.06.2003 № 231 (ОСТ 9150.11.0004-2003).

У здоровых людей количество бифидобактерий зависит от возраста: у детей до 1 года – $10^{10} - 10^{11}$; у пациентов от 1 года до 60 лет – $10^9 - 10^{10}$, а у пациентов старше 60 лет – $10^8 - 10^9$.

При интерпретации результатов исследования следует учитывать лабильность микробиоты кишечника в зависимости от экзогенных и эндогенных факторов и проводить 2-3-кратное исследование с интервалом 1-2 дня. Необходимо также учитывать, что полученные результаты не являются единственным признаком, определяющим диагноз и требуют дополнительной информации для принятия медицинского решения.

9. ТРЕБОВАНИЯ К УТИЛИЗАЦИИ (УНИЧТОЖЕНИЮ)

9.1. Серии среды Блаурокка, пришедшие в негодность, серии с истекшим сроком годности, а также упаковка (бутылки) подлежат утилизации (уничтожению) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", как отходы, принадлежащие к классу «А» - (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам), любым способом, предотвращающим повторное использование.

9.2. Утилизация (уничтожение) осуществляется предприятиями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в

помещениях с соблюдением обязательных требований нормативной документации по охране окружающей среды. Персонал, осуществляющий уничтожение изделий должен соблюдать правила безопасности проведения способа уничтожения.

9.3. Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной медицинской организации, использующей в своей работе медицинские изделия. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации. Ответственность за уничтожение изделия несут субъекты обращения изделий.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

10.1. Среду Блаурокка хранят на складе в герметично закрытой упаковке (бутылке) изготовителя в защищенном от света месте при температуре от 2 до 30°C . После вскрытия бутылки, среду Блаурокка полностью разливают по пробиркам и используют в тот же день. Допускается оставшиеся пробирки с не регенерированной средой до использования хранить в холодильнике при температуре 2-8 °C не более 7 дней.

Срок годности среды Блаурокка - 1 год.

10.2 Медицинское изделие – «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021, хранившееся с нарушением регламентированного режима, с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке применению не подлежит!

Медицинское изделие «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021 транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения. **Транспортирование среды Блаурокка при отрицательной температуре не допускается!**

Медицинское изделие «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021, транспортируемое с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит!

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

Изготовитель гарантирует соответствие медицинского изделия «Питательная среда для выявления бифидобактерий, готовая к применению (Среда Блаурокка)», заявленным в ТУ 20.59.52-344-78095326-2021 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения.

По всем вопросам, касающимся качества медицинского изделия «Питательная среда для выявления бифидобактерий готовая к применению (Среда Блаурокка)» по ТУ 20.59.52-344-78095326-2021, получения консультации и поддержки обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-10, 36-00-20, факс 36-01-16.

Заместитель директора
по научно-производственной работе



А.П.Шепелин

«Согласовано»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Варнавичус П.К.

«20»

2022 г.



11 (одинаковые)

листов. Подпись

" 24 "

10

20

