

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии»

И.А. Дятлов

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к
антимикробным препаратам, сухая (Бульон Мюллера-Хинтон)
по ТУ 20.59.52-376-78095326-2023

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, сухая (Бульон Мюллера-Хинтон)» по ТУ 20.59.52-376-78095326-2023 далее по тексту - Бульон Мюллера-Хинтон, предназначено для проведения количественных тестов по определению чувствительности микроорганизмов, выделенных из клинического материала, к антимикробным препаратам (АМП) с целью определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) для прогнозирования эффективности АМП при лечении инфекций у людей.

Область применения медицинского изделия - клиническая лабораторная диагностика

Функциональное назначение

Бульон Мюллера-Хинтон используется в качестве *вспомогательного* средства в диагностике *in vitro* для проведения количественных тестов по определению чувствительности быстрорастущих аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов к АМП практически всех функциональных групп методом разведений в бульоне с определением МПК при проведении клинической диагностики инфекционных заболеваний человека.

Риски применения медицинского изделия, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению

При использовании данного медицинского изделия необходимо строго соблюдать все требования к проведению процедуры определения чувствительности микроорганизмов к АМП, описанных в технической документации. В противном случае может быть назначена некорректная схема лечения (неправильный АМП).

Показания и противопоказания к использованию

Показанием к использованию данного медицинского изделия является необходимость определения чувствительности возбудителя инфекции бактериальной этиологии к АМП у пациента (например, инфекции верхних и нижних дыхательных путей, мягких тканей, раневые инфекции) при выборе наиболее эффективного антимикробного препарата для лечения пациентов.

Исследования чувствительности также проводят для эпидемиологического наблюдения за устойчивостью к АМП и сравнения новых и существующих АМП.

Противопоказания к использованию данного медицинского изделия не выявлены.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Бульон Мюллера-Хинтон предназначен для профессионального использования только для *in vitro* диагностики в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях при исследовании чистых культур микроорганизмов, выделенных из клинического материала, взятого по возможности, до начала антибактериальной терапии от пациентов любых возрастов и национальностей с инфекционными болезнями.

К работе допускается персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, обученный методам определения чувствительности микроорганизмов по ГОСТ Р ИСО 20776-1 и правилам работы в клиничко-диагностической и микробиологической лаборатории в установленном порядке и имеющий право работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности.

2. СОСТАВ

Бульон Мюллера-Хинтон представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок от светло-бежевого до темно-бежевого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов. Выпускается по 250 г в полиэтиленовых банках объемом 600 см³ и по 100 г в полиэтиленовых банках объемом 250 см³.

2.1. Принцип метода

Принцип метода заключается в определении чувствительности микроорганизмов к АМП методом разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК), т.е. наименьшей концентрации АМП (выраженной в мг/л), которая полностью подавляет рост микроорганизма в течение определенного времени.

Совокупность компонентов, входящих в состав Бульона Мюллера-Хинтон, обеспечивает рост широкого спектра микроорганизмов, выделенных из клинических образцов. Солянокислотный гидролизат казеина и мясной экстракт являются источниками питательных веществ (азота, витаминов, минеральных солей, аминокислот), необходимых для роста микроорганизмов, крахмал выступает в качестве фактора роста, функционируя как коллоидный протектор и нейтрализуя токсичные продукты, образующиеся в процессе роста микроорганизмов.

Состав Бульона Мюллера-Хинтон сконструирован с учетом сбалансированного содержания ионов кальция и магния, входящими в диапазон (20–25) мг/л и (10,0–12,5) мг/л, соответственно, с пониженным содержанием ионов марганца и цинка (ниже 8,0 мг/л и 3,0 мг/л, соответственно) и тимидина (менее 0,03 мг/л). Сбалансированное содержание ионов двухвалентных металлов и тимидина в Бульоне Мюллера-Хинтон необходимо для достоверного определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, карбапенемам и сульфаниламидным препаратам.

2.2. Состав, г/л:

– Солянокислотный гидролизат казеина, модифицированный, сухой (СГК модифицированный, сухой)	17,5
– Мясной экстракт	2,0
– Крахмал растворимый (амилодекстрин)	1,5

рН готовой среды от 7,2 до 7,4

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность (чувствительность среды, скорость роста и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов)

Бульон Мюллера-Хинтон должен обеспечивать во всех засеянных пробирках при посеве в 10 мл среды по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} через

18-24 ч инкубации при температуре (35±1) °С визуально обнаруживаемый рост тест-штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 в виде диффузного помутнения среды.

3.2. Показатель чувствительности микроорганизмов к АМП

Бульон Мюллера-Хинтон должен обеспечивать получение значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) антимикробных препаратов при определении чувствительности тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, соответствующих допустимым значениям (табл. 1), через (18±2) ч инкубации посевов при температуре (35±1) °С.

Таблица 1 – Допустимые минимальные подавляющие концентрации АМП для тест-штаммов на Бульоне Мюллера-Хинтон

АМП	Значения МПК антимикробных препаратов, мг/л							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>E. faecalis</i> ATCC 29213	
	допу- стимый интер- вал	целевое значе- ние	допу- стимый интер- вал	целевое значе- ние	допу- стимый интервал	целевое значе- ние	допу- стимый интервал	целевое значе- ние
Гентамицин	1,0-0,25	0,5	1,0- 0,125	0,5-0,25	2,0-0,5	1,0	-*	-*
Имипенем	-*	-*	-*	-*	4,0-1,0	2,0	2,0-0,5	1,0
Левифлоксацин	-*	-*	0,5-0,06	0,25- 0,125	4,0-0,5	2,0-1,0	2,0-0,25	1,0-0,5
Тетрациклин	-*	-*	1,0- 0,125	0,5-0,25	-*	-*	-*	-*
Тигециклин	0,25- 0,03	0,125- 0,06	0,25- 0,03	0,125- 0,06	-*	-*	0,125- 0,03	0,06
Триметоприм /сульфаметок сазол	≤0,5		≤0,5		-*		≤0,5	
Примечания: 1 * – определение с данными АМП не производят; 2 ** – значение МПК приведены по триметоприму.								

3.3. Клиническая эффективность

Клиническая эффективность была доказана при проведении клинических испытаний. При проведении клинических испытаний значения МПК антибиотиков, полученных методом микроодрезаний в бульоне с помощью МХБ–Оболенск и зарубежным аналогом МХБ для 15 клинических изолятов с обычными питательными потребностями и для 5 клинических изолятов со сложными питательными потребностями между собой не отличаются для всех протестированных штаммов, поэтому штаммы были отнесены к одним и тем же клиническим категориям чувствительности. Аналогичные клинические категории были получены и диско-диффузионным методом. Несмотря на то, что обоими методами (методом микроразведений в бульоне и диско-диффузионный метод) тестируемые штаммы были отнесены к идентичным клиническим категориям чувствительности, метод

микроразведений в бульоне, позволяет определить значения МПК антибиотиков – показателя эффективности антибиотикотерапии (в отличие от диско-диффузионного метода). Например, результаты тестирования *S. pyogenes* к линезолиду и триметоприму/сульфаметоксазолу показали, что исследуемый штамм чувствителен к обоим антибиотикам, но для терапии предпочтителен триметоприм/сульфаметоксазол, так как его значения МПК оказались ниже (0,25 мг/л), чем для линезолида (1,0 мг/л), поэтому большей эффективностью для терапии обладает антибиотик триметоприм/сульфаметоксазол. При использовании препаратов с более высокими значениями МПК следует учитывать неизбежное увеличение риска токсичности препарата. Применение для терапии препаратов с более высокими значениями МПК способствует токсичности препарата в организме.

Таким образом, результаты клинических исследований показали, что «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, сухая (Бульон Мюллера-Хинтон)» по ТУ 20.59.52-376-78095326-2023, производства ФБУН ГНЦ ПМБ, подготовленное в соответствии с Инструкцией по применению, по результатам испытаний *обеспечивает возможность* проведения количественных тестов по определению чувствительности микроорганизмов, выделенных из клинического материала, к АМП с целью определения МПК для прогнозирования эффективности АМП при лечении инфекций у людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения Бульона Мюллера-Хинтон в соответствии с Приказом МЗ РФ №4н от 06.6.2012 - класс 2 б.

4.2. Работу по определению чувствительности микроорганизмов к АМП методом разведений проводить с соблюдением правил СанПиН 3.3686-21 "Санитарные правила и нормы. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

4.3. Уничтожение Бульона Мюллера-Хинтон и остатков образцов после проведения исследования 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, 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 $(126 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

4.4. Не использовать медицинское изделие Бульон Мюллера-Хинтон, если нарушена

целостность упаковки или внешний вид не соответствует описанию, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции. Не использовать по истечении срока годности.

4.5. Медицинское изделие Бульон Мюллера-Хинтон не содержит пожароопасных и взрывоопасных веществ.

4.6. Бульон Мюллера-Хинтон не содержит лекарственных средств и материалов животного и человеческого происхождения влияющих на безопасность медицинского изделия.

4.7. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

- при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности медицинское изделие Бульон Мюллера-Хинтон безопасно.

- при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Шкаф биологической безопасности II класса защиты;
- Весы лабораторные I класса точности;
- Автоклав, обеспечивающий режим паровой стерилизации $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.;
- Термостат, обеспечивающий температуру $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- Модуль для автоматического считывания панелей (например, AutoReader, OptiRead или др.);
- Лупа 8×
- Автоматические одноканальные или восьмиканальные пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости на 10-200 мкл, 1000 мкл;
- Стерильные наконечники на 10-200 мкл, 1000 мкл
- Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО) 5 и 10 единиц соответствующего года выпуска;
- Микробиологическое лабораторное оснащение (петли, маркер, спиртовки);
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 250 мл, 500 мл и 1000 мл;
- Колбы объемом 250 мл;
- Пробирки стеклянные стерильные;
- Стерильные пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости на 2,0 мл, 5,0 мл и 10,0 мл;

- Стерильные резервуары для бактериальной суспензии тестируемого микроорганизма;
- Чашки Петри;
- Плотные питательные среды, удовлетворяющие питательным потребностям тестируемого микроорганизма;
- Пробирки стерильные полипропиленовые, вместимостью до 1,0 мл;
- Штатив-бокс для пробирок;
- Планшет 96-луночный;
- Пленка для закрывания планшета;
- Криопробирки или микропробирки;
- Штатив для криопробирок и/или микропробирок;
- Вода дистиллированная, стерильная;
- Стерильный физиологический раствор;
- Антимикробные препараты (фармацевтические субстанции), перечень которых зависит от вида и рода тестируемого изолята микроорганизма;
- Наборы реагентов для тестирования чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам с определением минимальной подавляющей концентрации, например, МПК–стрип, РУ № РЗН 2020/11345 от 17.07.2022 г.;
- Тест-штаммы микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 для контроля качества исследования.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Исследованию по оценке чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам подлежат чистые культуры быстрорастущих аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, как музейные, так и выделенные из клинического материала (изоляты), поступившие в бактериологическую лабораторию на плотной питательной среде без ингибиторов роста с направлением лечащего врача. В направлении должен быть указан вид клинического образца, предварительный диагноз и цель исследования: определение чувствительности выделенного возбудителя инфекции к АМП. Перечень АМП определяется в зависимости от вида и рода изолята с учетом данных об устойчивости к часто используемым антимикробным препаратам.

6.2. Преаналитический этап включает сбор проб, их маркировку, доставку в лабораторию, регистрацию поступившего материала и его подготовку для проведения исследований. Взятие клинического материала целесообразно проводить до начала антибактериальной терапии. Чистые культуры микроорганизмов из различных образцов

клинического материала (например, мазки из носоглотки, зева, глаз, отделяемое открытых ран, моча, отделяемое половых органов, кровь, мокрота, желчь, фекалии) должны быть выделены на плотных неселективных питательных средах, рекомендуемых при микробиологическом анализе конкретного клинического образца.

Для получения достоверных результатов следует соблюдать правила взятия клинического материала, условия его транспортировки в микробиологические лаборатории (соблюдение температурного режима и влажности), и требования по выделению предполагаемого возбудителя инфекционного заболевания. Исследуемые образцы клинического изолята хранить на плотных питательных средах при температуре 4-8 °С не более 7 дней.

Работу с материалом, содержащим культуры микроорганизмов, его хранение и обезвреживание проводить с соблюдением правил СанПиН 3.3686-21 "Санитарные правила и нормы Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования проводят в условиях бактериологической лаборатории медицинскими специалистами (например, врач-бактериолог, врач-медицинский микробиолог, врач-лаборант, иной специалист, имеющий право работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и ознакомленный с требованиями настоящей Инструкции по применению).

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП методом микроразведений с определением минимальных подавляющих концентраций, приготовление раствора с АМП, постановку метода и учет результатов проводят в соответствии с требованиями МУК 4.2.2316-08 и актуальных версий ГОСТ Р ИСО 20776-1 и Клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», EUCAST и CLSI.

Для постановки метода микроразведения в бульоне можно использовать 96-луночный планшет с плоскими лунками, вместимостью до 200 мкл (например, по ТУ 9393-009-16548645-2005, РУ № ФСР 2010/08676 от 15.04.2016 г), 96-луночный планшет с лунками круглой формы, вместимостью до 100 мкл (например, по ТУ 9398-057-00480230-2009, РУ № РЗН 2015/2664 от 13.05.2019 г). В случае отсутствия планшета возможно использование криопробирок или микропробирок (например, Servicebio, кат. № CV-2-ET-50, GenFollower, кат. №: WG00095). Количество используемых крио- или микропробирок должно быть эквивалентным количеству тестируемых изолятов и АМП. Для проведения исследования пробирки устанавливают на специальный штатив (например, Isolab, кат. № 080.01.101).

Постановку исследования также можно проводить с помощью Набора реагентов для тестирования чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК–стрип) в соответствии с инструкцией производителя (например, Mikrolatest РУ № РЗН 2020/11345 от 17.07.2022 г).

7.1 Приготовление Бульона Мюллера-Хинтон

Для определения показателя чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Бульон Мюллера-Хинтон готовят одним из способов:

А) С обычной концентрацией – 21,0 г среды размешивают в 1 л дистиллированной воды и стерилизуют автоклавированием при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

Б) С двойной концентрацией – 42,0 г среды размешивают в 1 л дистиллированной воды и стерилизуют автоклавированием при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. (Бульон Мюллера-Хинтон в двойной концентрации применяется для инокуляции в случае использования для тестирования рабочих растворов АМП и серий их двукратных разведений, приготовленных в стерильной дистиллированной воде)

Для постановки тестирования 21,0 г (в случае необходимости-двойную концентрацию) среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, разливают бульон в стеклянные пробирки (РУ № РЗН 2018/7649 от 28.09.2018 г) по 10 мл с помощью стеклянной пипетки (РУ № РЗН 2016/4740 от 29.05.2017 г) и стерилизуют автоклавированием при температуре $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин, или сначала стерилизуют бульон, а затем в асептических условиях разливают его в простерилизованные стеклянные пробирки с пробкой по 10 мл с помощью стерильной стеклянной пипетки.

Две-три пробирки со стерильным Бульоном Мюллера-Хинтон помещают в термостат и инкубируют при температуре $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 18-24 ч инкубации просматривают содержимое пробирок на возможный микробный рост. В пробирках микробный рост может визуализироваться в виде помутнения среды, образования осадка, пленки, газообразования и др. При обнаружении роста хотя бы в одной из 2-3 пробирок все приготовленные пробирки с Бульоном Мюллера-Хинтон утилизируют, и готовят новую партию.

Для приготовления объема питательной среды, отличного от 1 л, количество навески рассчитывают по формуле: $A = (\text{навеска} \times V) : 1000$, где:

A – количество среды, необходимой для приготовления требуемого объема среды, г;

V – требуемый объем питательной среды, мл;

Навеска (21 или 42) г – количество среды, указанное на этикетке, для приготовления 1000 мл среды, г.

После каждого вскрытия, банку с сухой средой плотно закрыть и хранить до окончания срока годности в сухом месте при температуре от 2 до 30°C, избегая попадания влаги.

Ограничения метода.

При определении чувствительности клинических изолятов со сложными питательными потребностями, таких как *Streptococcus* spp., *Haemophilus influenzae* и др., в Бульон Мюллера-Хинтон требуется внести 5 % лизированной лошадиной крови и 20,0 мг/л β -NAD (CAS: 53-84-9). Лизированную лошадиную кровь можно приготовить из дефибринированной лошадиной крови. Для чего в дефибринированную лошадиную кровь добавляют стерильную деионизированную воду в соотношении 1:1, помещают в морозильную камеру на (8 ± 1) ч при температуре $(-20)^\circ\text{C}$. Затем размороженную при комнатной температуре кровь повторно подвергают замораживанию-оттаиванию, повторяя данный цикл 4 раза до полного лизиса кровяных клеток. После этого лизированную лошадиную кровь осветляют центрифугированием при 7000 об/с в течение 30 мин на центрифуге (например, Eppendorf Centrifuge 5702).

При использовании Бульона Мюллера-Хинтона не в день приготовления, его следует хранить при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 14 сут. После хранения, Бульон Мюллера-Хинтон необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин до начала исследования.

7.2 Приготовление питательных сред для контроля концентрации и микробиологической чистоты микробной суспензии исследуемого образца клинического изолята.

Для контроля концентрации и микробиологической чистоты микробной суспензии готовят неселективные питательные среды, удовлетворяющие питательным потребностям исследуемого микроорганизма в соответствии с инструкцией производителя.

7.3 Приготовление основных и рабочих растворов антимикробных препаратов

Приготовление основных и рабочих растворов антимикробных препаратов, перечень которых зависит от вида и рода клинического изолята, к которому определяют чувствительность к АМП, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1. Рабочие растворы АМП готовят в Бульоне Мюллера-Хинтон и они должны быть использованы в день приготовления, если нет информации об их стабильности при определенных условиях хранения.

Примечание – Возможно использование стерильной дистиллированной воды для приготовления рабочих растворов АМП.

Важно отметить, что для проведения тестирования готовят удвоенную концентрацию растворов АМП (от требуемой) с учетом разведения ее в два раза Бульоном

Мюллера-Хинтон с исследуемым микроорганизмом при инокуляции.

7.4 Подготовка планшетов или пробирок для проведения исследования

Для постановки исследования берут по одному планшету для каждого тестируемого микроорганизма. По длинной стороне планшетов (верхняя часть) делают маркировку с указанием АМП, засеваемого микроорганизма и датой исследования.

Планшет с плоскодонными лунками в стерильных условиях заполняют по 0,1 мл (100 мкл) стерильным Бульоном Мюллера-Хинтон с помощью стерильной пипетки или автоматической пипетки со стерильным наконечником, кроме 12 верхних. Для удобства заполнения планшета рекомендуется использовать 8 или 12-канальную пипетку.

Затем приступают к заполнению планшета рабочими раствора АМП. Для этого в каждую из 12 незаполненных верхних лунок с помощью стерильной пипетки или автоматической пипетки со стерильными наконечниками вносят по 0,2 мл (200 мкл) раствора АМП, приготовленного в соответствии с п. 7.3. После этого делают двукратные разведения АМП. Для этого с помощью стерильной пипетки, желательно 8 или 12-канальной, из 12 верхних лунок отбирают по 0,1 мл (100 мкл) антибиотика, переносят в следующие лунки с Бульоном Мюллера-Хинтон (по направлению от верхней маркированной части планшета до нижней) и тщательно перемешивают. Повторяют аналогичные действия до предпоследнего (седьмого) ряда лунок, из которого после перемешивания отбирают по 0,1 мл рабочих растворов АМП и сливают в специальную емкость (например, кристаллизатор с диаметром не менее ширины 8- или 12-канальной рабочей пипетки). В последний ряд лунок раствор с АМП не переносят. Заполненные планшеты не хранить! Проводить тестирование в день приготовления!

При заполнении планшета с лунками круглой формы уменьшают объем Бульона Мюллера-Хинтон до 0,05 мл (50 мкл), а объем рабочих растворов АМП до 0,1 мл (100 мкл).

Примечание – Приготовление серии двукратных разведений растворов АМП можно проводить с использованием стерильной дистиллированной воды (вместо Бульона Мюллера-Хинтон).

7.5 Приготовление инокулята и посев

Бактериологической петлей отобрать 2-3 колонии чистой 18-24 ч культуры исследуемого микроорганизма, поступившего в бактериологическую лабораторию для анализа в соответствии с требованиями п. 6.1. Затем перенести ее в пробирку со стерильным 0,9% раствором натрия хлористого и довести концентрацию микробной взвеси до 5 МЕ по отраслевому стандартному образцу мутности (ФСО 3.1.00086/ОСО42-28-86). Затем полученные микробные взвеси развести в соотношении 1:2 (1 мл микробной взвеси и 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлористого) до концентрации $(1,0-2,0) \times 10^8$ КОЕ/мл (рабочее разведение), что эквивалентно 0,5 ед. по Стандарту МакФарланда.

После этого переносят 0,1 мл (100 мкл) полученной микробной суспензии в 9,9 мл Бульона Мюллера-Хинтон, т.е. разводят ее в 100 раз. Конечная концентрация исследуемого микроорганизма должна находиться в диапазоне $(1,0-2,0) \times 10^6$ КОЕ/мл.

Затем все лунки планшета с плоскодонными лунками заполняют по 0,1 мл (100 мкл) бульона, засеянного тестируемым микроорганизмом, планшеты с лунками круглой формы – по 0,05 мл (50 мкл). Конечная концентрация исследуемого микроорганизма в каждой лунке/пробирке должна находиться в диапазоне $(2,5-5,0) \times 10^5$ КОЕ/мл.

Примечание – В случае использования для тестирования рабочих растворов АМП и серий их двукратных разведений, приготовленных в стерильной дистиллированной воде, следует использовать для инокуляции Бульон Мюллера-Хинтон в двойной концентрации, приготовленный из расчета 42 г/л.

Для контроля концентрации приготовленной бактериальной суспензии и ее микробиологической чистоты необходимо отобрать 10 мкл (0,01 мл) суспензии из лунки планшета или пробирки без АМП, перенести в 10 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлористого и по 100 мкл (0,1 мл) инокулировать на чашки Петри с питательной средой, удовлетворяющей питательным потребностям тестируемого микроорганизма.

Время от приготовления микробной суспензии до посева не должно превышать 15 мин. При работе с 8-канальной пипеткой можно воспользоваться специальной стерильной ванночкой (резервуаром) для многоканальных пипеток или чашкой Петри соответствующего диаметра, в которые переносят Бульон Мюллера-Хинтон с исследуемым микроорганизмом.

7.6 Инкубация

Засеянные планшеты закрыть крышкой или пленкой и поместить в полиэтиленовый пакет. Во избежание высыхания содержимого лунок, необходимо подогнуть открытый край пакета под планшет. Затем пакет с засеянными планшетами и инокулированные чашки Петри инкубировать в термостате при температуре $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16-20 ч. При инкубации планшеты можно ставить друг на друга, но не более трех, так как нарушается теплообмен находящегося в середине планшета.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

После окончания инкубации достать чашки Петри и посчитать количество выросших колоний. Количество колоний должно находиться в диапазоне от 20 до 80. При получении смешанной культуры и недопустимого числа колоний исследуемой культуры результаты по определению чувствительности микроорганизмов не учитываются! Для дальнейшего учета результатов так же является обязательным условием наличие роста в лунке без АМП. Только в случае соблюдения перечисленных условий провести учет результатов.

Учет результатов можно проводить либо автоматически с помощью ридера, например, AutoReader или OptiRead в соответствии с инструкцией, либо визуально. Для визуального учета планшет помещать на горизонтальную поверхность с темным или зеркальным фоном и регистрировать рост тестируемого микроорганизма по помутнению среды, формированию пленки или осадка на дне лунок. Значение МПК считывают в первой лунке в ряду с АМП, в которой полностью отсутствует видимый рост тестируемого микроорганизма.

Полученные значения МПК антимикробных препаратов сопоставить с пограничными значениями, представленными в интерпретационных таблицах актуальных версий стандартов EUCAST или CLSI. Затем определить категорию клинической чувствительности тестируемого микроорганизма: S, R или I. В соответствии с положениями стандарта EUCAST: S – чувствительный при стандартном режиме дозирования, I – чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата или R – резистентный.

В случае возникновения трудностей с определением клинической категории чувствительности при анализе получаемых результатов, например отнесение тестируемого клинического образца к «зоне технической неопределенности (Area of Technical Uncertainty) (ATU)», следует воспользоваться результатами дополнительных исследований, например, диско-диффузионного метода, метода градиентной диффузии (Е-тесты), автоматизированных анализаторов для определения чувствительности микроорганизмов к АМП (VITEK 2, Sensititre и др.).

9. ТРЕБОВАНИЯ К УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЮ

Бульон Мюллера-Хинтон, пришедший в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А» – эпидемиологически безопасные отходы, любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Утилизация планшетов и чашек Петри после проведения биологического контроля осуществляется по СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 60 мин при температуре $(126 \pm 2)^\circ\text{C}$. Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Бульон Мюллера-Хинтон хранят в герметично закрытой производственной упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре (от +2 до + 30)° С. После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30°С, избегая попадания влаги.

Срок годности составляет 24 месяца.

Бульон Мюллера-Хинтон с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Бульон Мюллера-Хинтон транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре (от - 18 до + 40) °С не более 7 суток.

Изготовитель гарантирует соответствие медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, сухая (Бульон Мюллера-Хинтон)» заявленным в ТУ 20.59.52-376-78095326-2023 требованиям и функциональным характеристикам в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения и транспортирования.

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

По всем вопросам, касающимся качества медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, сухая (Бульон Мюллера-Хинтон)» по ТУ 20.59.52-376-78095326-2023, для получения консультации, обращаться по адресу предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-10, факс 36-01-20.

Заместитель директора
по качеству и развитию



М.В. Храмов

«Согласовано»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



Варнавичус П.К.

«31» 10 2023 г.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«31» 10 2023 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

