

Федеральное бюджетное учреждение науки
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. ПАСТЕРА**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)
197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14. Телефон (812) 233-20-92, факс (812) 644-63-10
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; www.pasteurorg.ru
ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314; ИНН/КПП 7813047047/781301001

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора дисков для определения чувствительности
к противомикробным препаратам – 2
(НД-ПМП-2)
ТУ 017-01967164-2015

Для научных исследований

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор дисков НД-ПМП-2 предназначен для определения чувствительности возбудителей разных заболеваний человека и животных, выделенных из патологического материала больных, к различным противомикробным препаратам, применяемым для лечения.

Один диск рассчитан на проведение одного определения чувствительности микроорганизмов к соответствующему противомикробному препарату.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на определении диаметра зоны подавления роста культур при воздействии соответствующего противомикробного препарата. Определение проводят после посева испытуемых штаммов на агар Мюллера-Хинтон (АГВ), на поверхность которого наносят диски с соответствующими противомикробными лекарственными средствами. Диаметр зоны учитывают по полному подавлению роста микроорганизмов, определяемому визуально. Диаметры зон измеряют с точностью до 1 мм при помощи штангенциркуля или линейки.

Оценку чувствительности микроорганизмов к противомикробному препарату проводят, сопоставляя полученные результаты со значениями таблицы 1.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Набор дисков предназначен только для *in vitro* диагностики.

Компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08, СанПиН 2.1.7.2790-10.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

1. Приготовление питательных сред.

Для определения чувствительности рекомендуется использовать агар Мюллера-Хинтон или сухую питательную среду АГВ. Среды готовят из сухих порошков в соответствии с инструкциями по их применению.

При использовании среды АГВ желательнее проводить контроль качества среды. Наиболее приемлемым способом контроля качества питательных сред является оценка чувствительности референсных штаммов с последующим сравнением полученных результатов с паспортными данными штаммов.

В первую очередь необходимо использовать штамм *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853. Среду следует считать удовлетворительной по качеству, если диаметр зоны подавления роста вокруг диска, содержащего 10 мкг гентамицина, находится в пределах 16-21 мм. Выбор гентамицина для контроля качества связан с тем, что аминогликозидные антибиотики наиболее чувствительны к колебаниям концентрации двухвалентных катионов.

2. Приготовление чашек.

Расплавленную среду разливают в стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, в таком объёме, чтобы толщина слоя среды была равна $4,0 \pm 0,5$ мм: на чашку диаметром 9 см – 20 мл; диаметром 10 см – 25 мл среды. Чашки со средой подсушивают в термостате при температуре $+35-37^\circ\text{C}$ и используют через 15-30 мин.

3. Приготовление инокулята и нанесение его на поверхность агаровой среды.

Инокулят готовят из чистой 18-20-часовой культуры бактерий, выросшей на поверхности плотной питательной среды. Для этого 4-5 изолированных колоний суспендируют в жидкой питательной среде или физиологическом растворе. В качестве инокулята можно использовать также 18-20-часовую бульонную культуру. Концентрацию суспензии из агаровой культуры или бульонной культуры устанавливают по стандарту мутности 0,5 по МакФарланду, соответствующему $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Инокулят сразу после приготовления наносят на поверхность агаровой среды стерильным ватным коммерческим тампоном. Тампон смачивают в инокуляте, слегка отжимают о стенки пробирки и наносят им культуру в трёх различных направлениях, каждый раз поворачивая чашку Петри на 60° , чтобы получить как можно более равномерный газон. В случае, если нанесение инокулята стерильным ватным тампоном невозможно, его разводят ещё в 10 раз физиологическим раствором (конечная концентрация 10-20 млн КОЕ/мл). 1,0-2,0 мл разведённого в 10 раз инокулята наносят на поверхность чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяют по поверхности покачиванием и удаляют избыток жидкости пипеткой. Чашки с нанесённым инокулятом оставляют при комнатной температуре ($+18-25^\circ\text{C}$) на 15 мин (но не более; в случае нанесения инокулята ватным тампоном достаточно 3-5 мин) для абсорбции инокулята.

4. Нанесение дисков.

Диски с помощью пинцета накладывают на поверхность заражённой питательной среды не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на одинаковом расстоянии один от другого (~30 мм) и на расстоянии ~20 мм от края чашки. На одну чашку следует помещать не более 6 дисков.

5. Инкубация чашек.

Чашки ставят в термостат сразу после нанесения дисков. Инкубируют в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма) при температуре +35-37°C перевёрнутыми вверх дном.

6. Учёт результатов.

Чашки помещают вверх дном на тёмную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом 45° (учёт в отражённом свете). Допускается учёт результатов в проходящем свете, однако в этом случае отмечается большая субъективность в оценке диаметров зон задержки роста.

С помощью штангенциркуля или линейки измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков со стороны микробного газона, включая диаметр самих дисков, с точностью до одного миллиметра. Не следует обращать внимание на очень мелкие колонии, выявляемые при определённых условиях освещения в пределах зоны задержки роста. При нерезко очерченных краях зон или зонах с двойными контурами следует измерять диаметры по наиболее чёткому контуру, игнорируя мелкие колонии или едва заметный газон у края зоны. При наличии больших колоний по периферии зоны граница её определяется местоположением внутреннего края этой группы колоний. Если крупные колонии распределены по всей зоне, культуру следует проверить на однородность, а испытания повторить. Наличие таких колоний при отсутствии загрязнения инокулята позволяет предположить наличие гетерорезистентной популяции.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценку результатов проводят по таблице 1, которая содержит пограничные значения диаметров зон подавления роста для устойчивых, промежуточных и чувствительных штаммов.

К чувствительным относятся штаммы микроорганизмов, рост которых подавляется при концентрациях препарата, обнаруживаемых в сыворотке крови больного при использовании обычных доз противомикробных препаратов. К промежуточным относятся штаммы, для подавления роста которых требуются концентрации, создающиеся в сыворотке крови при введении максимальных доз препарата. Устойчивыми являются микроорганизмы, рост которых не подавляется препаратом в концентрациях, создаваемых в организме при использовании максимально допустимых доз.

Таблица 1

Интерпретация значений диаметров зон подавления роста при определении чувствительности к противомикробным препаратам микроорганизмов с обычными питательными потребностями

Наименование дисков с препаратами	Содержание препарата в диске, мкг	Среда	Диаметры зон для культур, мм		
			Устойчивых	Промежуточных	Чувствительных
Дорипенем для энтеробактерий для <i>P. aeruginosa</i>	10	1	≤19 ≤15	≥23 ≥19	≥23 ≥19
Нитроксолин	20	2	≤12	13-29	≥30
Тилозин для <i>S. aureus</i>	15	3	≤13	14-20	≥21
Цефоперазон/сульбактам для энтеробактерий для <i>P. aeruginosa</i> для <i>S. aureus</i> (для метициллинчувствительных штаммов)	50/50	4	≤16 ≤15 ≤12	17-19 16-19 13-17	≥20 ≥20 ≥18
Энрофлоксацин	5	3	≤17	18-21	≥22

Примечания:

1 – среда Мюллера-Хинтон согласно Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. – 2012. - Vol.32, №3;

2 – среда Мюллера-Хинтон (предварительные данные);

3 – среда АГВ (предварительные данные);

4 – агар Мюллера-Хинтон согласно временным рекомендациям по интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов к цефоперазону/сульбактаму 1:1 (сульперазону) методом диффузии в агар с использованием дисков, содержащих 50 мкг цефоперазона и 50 мкг сульбактама. (Рекомендации Научно-методического центра Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию по мониторингу антибиотикорезистентности. 214019, Россия, Смоленск, ул. Крупской, 28, а/я 5).

Применение таблицы 1 для интерпретации результатов определения чувствительности возможно только при соблюдении строго стандартных условий постановки определения и использования стандартных питательных сред.

Для оценки воспроизводимости и точности процедуры определения чувствительности необходимо при каждой постановке теста параллельно с испытуемыми штаммами использовать контрольные штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Диаметры зон подавления роста контрольных штаммов указаны в таблице 2. Контрольные штаммы могут быть использованы для проверки качества питательной среды, дисков и правильности методики постановки определения.

Таблица 2

Допустимые пределы значений диаметров зон подавления роста контрольных штаммов микроорганизмов

Противомикробный препарат	Содержание в диске, мкг	Среда	Диаметры зон подавления роста контрольных культур, мм		
			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Дорипенем	10	1	33-42	27-35	28-35
Нитроксолин	20	2	–	20-26	–
Тилозин	15	3	–	–	–
Цефоперазон/сульбактам	50/50	4	–	–	–
Энрофлоксацин	5	3	–	–	–

Примечания:

1 – среда Мюллера-Хинтон согласно Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. – 2012. - Vol.32, №3;

2 – среда Мюллера-Хинтон (предварительные данные);

3 – среда АГВ (предварительные данные);

4 – агар Мюллера-Хинтон согласно временным рекомендациям по интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов к цефоперазону/сульбактаму 1:1 (сульперазону) методом диффузии в агар с использованием дисков, содержащих 50 мкг цефоперазона и 50 мкг сульбактама. (Рекомендации Научно-методического центра Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию по мониторингу антибиотикорезистентности. 214019, Россия, Смоленск, ул. Крупской, 28, а/я 5).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Набор дисков следует хранить при температуре +2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в сухом тёмном месте в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 15 сут.

Сроки годности набора – 12 мес.

Перед использованием флаконы с дисками следует выдержать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 1 ч для предотвращения образования конденсата на внутренней стенке флакона.

Вскрытый флакон с дисками можно хранить при температуре +2-8°C в течение всего срока годности набора, при условии сохранения цвета индикаторного силикагеля от светло-голубого до синего.

Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу:

197101, Россия, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14

Телефон (812) 233-20-92, (812) 644-63-17, факс (812) 644-63-10

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru

