

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

УТВЕРЖДЕНА
Приказом по Росздравнадзору
№ 10159-Пр/09 от 10 декабря 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора дисков для определения чувствительности
к противомикробным препаратам – 1
(НД-ПМП-1)

ТУ 9398-006-01967164-2009

Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/06290 от 16.08.2011 г.

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (далее по тексту – МИ) для диагностики *in vitro* «Набор дисков для определения чувствительности к противомикробным препаратам – 1 (НД-ПМП-1)», разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Адрес: 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 233-20-92, факс: (812) 644-63-10, электронный адрес: pasteur@pasteurorg.ru, официальный веб-сайт: <https://pasteurorg.ru>.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор дисков НД-ПМП-1 предназначен для определения чувствительности исследуемой культуры бактерий, выделенных из биологических образцов пациентов, к противомикробным препаратам диско-диффузионным методом при однократном использовании в ходе клинико-лабораторной диагностики.

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Применять в соответствии с назначением. При соблюдении требований инструкции по применению противопоказаний к применению не выявлено.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Лабораторная диагностика.

ТИП АНАЛИЗИРУЕМОГО ОБРАЗЦА

Чистая культура бактерий, выделенных из биологических образцов пациента.

КЛАССИФИКАЦИОННЫЕ ПРИЗНАКИ

Медицинское изделие одноразовое, не инвазивное, нестерильное.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛИ

Потенциальными потребителями МИ являются сотрудники лечебно-профилактических и медицинских учреждений, имеющие квалификацию фельдшера-лаборанта (медицинского лабораторного техника), врача-микробиолога, врача-бактериолога или биолога, обученными методам и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории, допущенными к работе с патогенными биологическими агентами, прошедшими обучение на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА III-IV групп (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

КЛИНИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К СФЕРЕ ПРИМЕНЕНИЯ МИ

Клинические состояния при инфекционных заболеваниях, вызванных проникновением в организм человека патогенных бактерий, преодолевающих его сопротивляемость, чрезвычайно многообразны. Их широкий спектр не редко требует применения противомикробных препаратов (ПМП), подавляющих рост и токсигенное действие вирулентных бактерий. Ввиду широкого распространения антибиотикорезистентности у бактерий в определенных случаях возникает необходимость определения чувствительности бактерий, которые являются предполагаемыми возбудителями заболевания, к определенным ПМП, особенно если есть подозрение, что они принадлежат к виду, который мог бы проявлять резистентность (устойчивость) к часто используемым противомикробным препаратам.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Диск из картона фильтровального, пропитанный противомикробным препаратом (ПМП) в определенной концентрации, помещают на чашку Петри с плотной питательной средой, засеянной культурой бактерий, выделенных из клинического материала. Диффузия ПМП из диска в питательную среду вызывает подавление роста исследуемой культуры и приводит к образованию вокруг диска видимой зоны задержки роста бактерий. Сравнение полученных значений диаметра зон задержки роста с их пограничными значениями позволяет определить чувствительность исследуемой культуры бактерий к препарату.

КОМПОНЕНТЫ МИ

Компонентами МИ являются диски из картона фильтровального диаметром 6,0 мм в количестве 100±5 диск/флакон с нанесенными на них в определенном количестве ПМП.

РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ

МИ при его использовании по целевому назначению безопасно и не обладает токсичностью.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РИСК ПРИМЕНЕНИЯ

По степени потенциального риска применения МИ относится к классу 2а. Все компоненты МИ в используемых концентрациях являются нетоксичными.

ПРЯМОЙ РИСК ПРИМЕНЕНИЯ

Неиспользованные компоненты МИ непосредственно не представляют биологической или химической опасности, однако, в ходе исследования диски соприкасаются с микроорганизмами, выделенными из клинического материала, в связи с чем представляют собой инфицированный материал, обращаться с которым следует, соблюдая технику безопасности.

КОСВЕННЫЙ РИСК ПРИМЕНЕНИЯ

Косвенный риск применения МИ связан с возможностью получения ошибочных результатов при определении диаметров зон задержки роста, что может привести к неправильному решению в отношении клинической категории чувствительности тестируемых культур микроорганизмов к антибиотикам, снижению эффективности соответствующих мониторинговых исследований и разрабатываемых на их основе противоэпидемических и лечебных мероприятий. Причинами получения неправильных значений диаметров зон задержки роста могут быть: 1) порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортирования и хранения до использования; 2) превышение сроков хранения, указанных на этикетках, 3) несоблюдение требований инструкции по применению МИ в ходе проведения анализа; 4) использование смешанной культуры, содержащей микроорганизмы нескольких бактериальных видов. Соблюдение требований, предъявляемых к транспортированию, хранению и использованию МИ согласно инструкции по применению МИ, гарантирует нивелирование косвенного риска применения.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с потенциально опасными чистыми культурами или эталонными штаммами бактерий необходимо соблюдать требования национального законодательства (для РФ – СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Работа с такими пробами должна проводиться в лабораториях, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями III–IV групп патогенности, специально обученным персоналом.

МИ не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

ОСОБЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

При работе необходимо выполнять следующие требования:

- температура в помещении лаборатории должна быть от +20 до +28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;
- не использовать МИ, если нарушена внутренняя упаковка;
- не использовать МИ, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- не использовать МИ по истечении срока годности;
- использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы.

ТРЕБУЕМОЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для использования МИ в лаборатории необходимо иметь следующее дополнительное оборудования и материалы:

- боксы микробиологической безопасности БМБ-II – «Ламинар-С»;
- холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 °С до +8 °С и от минус 18 °С до минус 25 °С;
- термостат электрические суховоздушные, поддерживающие температуру (35±1) °С;
- комплект механических дозаторов со стерильными наконечниками или пипетки;
- денситометр для измерения мутности клеточных суспензий 0,0 - 6,0 McF (единиц МакФарланда) или набор стандартов мутности МакФарланда;
- горелка спиртовая;
- петли и иглы бактериологические;
- чашки Петри стерильные;
- зонд-тампон медицинский одноразовый, стерильный;
- пинцет анатомический стерильный;

- линейка-шаблон для измерения размеров зон задержки роста микроорганизмов или другие средства измерения, пригодные для определения диаметра зон задержки роста (штангенциркуль или линейка с ценой деления 1 мм);
- сухие питательные среды: агар Мюллера-Хинтона-для бактерий с обычными питательными потребностями, агар Мюллера-Хинтона с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД- для бактерий со сложными питательными потребностями, среда АГВ, питательный агар для культивирования микроорганизмов ГРМ-агар.
- эталонные штаммы: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922;
- готовый стерильный изотонический 0,9 % раствор хлорида натрия;
- вода дистиллированная;
- мерные цилиндры, флаконы и колбы стеклянные;
- емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- комплект спецодежды – халат, шапочка, обувь;
- резиновые (латексные, нитриловые, виниловые) неопудренные перчатки одноразового применения.

Допускается применения других материалов и оборудования, эквивалентных по характеристикам и квалификации.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие, транспортирование и хранение биологического материала следует осуществлять согласно требованиям МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»). Определение чувствительности следует проводить с использованием только чистой культуры бактерий, рассматриваемых в качестве этиологического агента инфекционного процесса.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПОДГОТОВКА ЧАШЕК ПЕТРИ С АГАРОМ МЮЛЛЕРА-ХИНТОНА

Для оценки чувствительности исследуемой культуры к АМП использовать агар Мюллера-Хинтона-2 в качестве питательной среды. Для определения чувствительности прихотливых микроорганизмов используется агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД. Прихотливые микроорганизмы – это микроорганизмы, не растущие на простых питательных средах и требующие обогащения их специальными добавками (кровью, сывороткой крови, витаминами и т.п.) и создания особого состава атмосферы инкубации (5% CO₂). К ним относятся *Streptococcus spp.* (включая *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* и *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium spp.*, *Aerococcus sanguinicola u urinae*, *Kingella kingae* и *Brucella melitensis*.

Для определения чувствительности штаммов используют чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде (ГРМ агар для неприхотливых и агар Мюллера-Хинтона с кровью для прихотливых). Приготовить питательную среду согласно инструкции производителя и внести в чашки Петри таким образом, чтобы толщина пластины агара в чашке Петри составляла (4 ± 0,5) мм, что приблизительно соответствует 25 мл агара на чашку Петри диаметром 90 мм, 31 мл на чашку Петри диаметром 100 мм, 71 мл на чашку Петри диаметром 150 мм. Поверхность агара перед использованием должна быть сухой, так как при высокой влажности поверхности среды возможно формирование нечеткого края зоны задержки роста микробов. На внутренней поверхности крышки чашки Петри также не должно быть видимых капель влаги. Поэтому после застывания среды, при наличии конденсата на крышках подсушить чашки в термостате при температуре 30 – 35 °С или при 20 – 25 °С в течение 16 – 18 ч с открытой крышкой. Допускается хранение чашек с агаром в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4 – 8 °С в течение 5 суток. Допускается использование готового к применению агара в чашках Петри.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНОКУЛЮМОВ

Стерильной бактериологической петлей или зонд-тампоном собрать несколько морфологически схожих колоний чистой 18 – 24 часовой культуры бактерий и ресуспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе. Мутность бактериальной суспензии необходимо довести до 0,5 ед. по стандарту мутности МакФарланда путем добавления стерильного изотонического раствора или бактериальной массы. Использование суспензии более высокой или низкой плотности может привести к получению недостоверных результатов определения значений зон задержки роста. Для измерения концентрации суспензии следует использовать стандарт мутности МакФарланда. Стандартизованный инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления, но не позднее 60 мин.

ИНОКУЛЯЦИЯ ЧАШЕК С АГАРОМ

Перед инокуляцией чашек необходимо убедиться, что чашки с агаром имеют комнатную температуру и сухую поверхность агаровой пластины. Инокулюм следует нанести (посеять) на агар во временном интервале 15 – 60 мин после ее приготовления.

Посев культуры на агар необходимо выполнять по следующей методике:

- погрузить стерильный зонд-тампон в приготовленный инокулюм;
- для грамотрицательных бактерий необходимо удалить избыток суспензии, отжимая тампон о внутренние стенки пробирки, чтобы избежать нанесения избыточного количества инокулюма;
- для грамположительных бактерий отжимать тампон о внутренние стенки пробирки не следует;
- провести посев штриховыми движениями в 3 направлениях, поворачивая чашу на 60 градусов, наносить инокулюм равномерно на всю поверхность агара таким образом, чтобы штрихи плотно прилегали друг к другу, при этом следить за плотностью нанесения штрихов при работе с грамположительными бактериями. Подсушить чашки с культурой при комнатной температуре от +15 до +25 °С в течение 15 мин.

НАНЕСЕНИЕ (АППЛИКАЦИЯ) ДИСКОВ И ИНКУБАЦИЯ

Флаконы с дисками необходимо выдержать при температуре 18 – 24 °С в течение не менее 2 ч с целью предотвращения образования конденсата на дисках, что может привести к снижению активности некоторых АМП.

аппликацию дисков на поверхность агара необходимо выполнять с помощью анатомического пинцета по следующей методике:

- извлечь с помощью пинцета диск из флакона и, не касаясь пинцетом питательной среды, положить диск на поверхность агара;
- аккуратно прижать диски к поверхности питательной среды пинцетом.

Во время аппликации дисков соблюдать следующие правила:

- количество дисков на одной чашке Петри должно быть ограниченным для предотвращения перекрытия зон задержки роста и взаимодействия между антибиотиками; максимальное количество дисков на одну чашку диаметром 90 мм – не более 6 дисков, а на чашку диаметром 150 мм – не более 12 дисков;
- следить за тем, чтобы контакт диска с поверхностью инокулированного агара был плотным и полным, в противном случае диски придавливают к агару пинцетом;
- диски на поверхность плотной питательной среды нанести не позднее, чем через 15 мин после инокуляции агара, поскольку длительное пребывание инокулированных чашек при комнатной температуре может привести к началу роста бактериальной культуры и ложному уменьшению зоны задержки роста;
- нельзя перемещать диски после их нанесения, так как диффузия антибиотика в агар начинается сразу после аппликации.

Инкубацию чашек с дисками следует проводить следующим образом:

- установить температуру в термостате (35 ± 1) °С;
- перевернуть чашки дном вверх и убедиться, что диски не падают с поверхности агара;
- начать инкубацию не позже, чем через 15 мин после нанесения дисков с АМП;
- расположить чашки Петри в термостате (пять чашек в стопке является оптимальным количеством).

При соблюдении правил подготовки инокулюма, инокуляции, аппликации и инкубации через 16 – 20 ч инкубации по всей поверхности агара должен сформироваться равномерный сплошной слой бактериального роста, а вокруг дисков должны сформироваться просветленные зоны задержки роста круглой формы. Формирование отдельных колоний вместо сплошного роста свидетельствует о недостаточной плотности инокулюма. В этом случае исследование необходимо повторить.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки диаметров зон задержки роста чашку Петри с закрытой крышкой расположить на темную матовую поверхность дном вверх так, чтобы свет падал на нее под углом 45° (учет в отраженном свете). Измерить видимый невооруженным глазом диаметр зоны полного задержки роста микроорганизма с точностью до 1 мм при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз. Измерение следует проводить при помощи линейки-шаблона для измерения размеров зон задержки роста микроорганизмов (ПУ № ФСЗ 2009/03610) или других средств измерения, пригодных для определения диаметра зон задержки роста (штангенциркуль, калипер). Оценку результатов проводят согласно российским и международным рекомендациям, содержащим пограничные значения диаметров зон задержки роста и соответствующие им клинические категории чувствительности бактерий к ПМП (Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, КМАХ.; - EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; нормативно-справочная информация Министерства здравоохранения Российской Федерации, справочник «Параметры чувствительности к антимикробным препаратам» – <https://nsi.rosminzdrav.ru/dictionaries/1.2.643.5.1.13.13.99.2.1093/passport/latest>) при тестировании культур бактериальных изолятов из биологических образцов: «чувствительные при стандартном режиме дозирования (S)», «чувствительные при увеличенной экспозиции (промежуточный – I)», «резистентные (R)». **Обязательным является использование последней актуальной версии нормативного документа.**

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Набор дисков НД-ПМП-1 следует хранить при температуре от +2 до +8 °С в упаковке предприятия-изготовителя в сухом темном месте в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 15 сут. Сроки годности набора – 12 мес.

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

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

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

УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

МИ не является источником опасных излучений и не выделяет вредных веществ, загрязняющих окружающую среду выше установленных норм.

По вопросам, касающимся качества набора НД-ПМП-1, 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