



**ГРУППА КОМПАНИЙ
ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ**
общество с ограниченной ответственностью
191119, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Черняховского, дом 10, лит. В, оф. 60,
Тел./факс: (812) 575-58-80
www.animal-health.ru



**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ (НИЦФ)**
общество с ограниченной ответственностью
92236, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Белы Куна, д.30, литер А.
Тел./факс: (812) 327-55-81, тел:(812) 320-71-69
www.nicf.spb.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель
ГК «ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ»
кандидат ветеринарных наук
Щелёткина С.В.
«18» января 2021 года



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ»
Гришко Ю.В.
«18» января 2021 года



ИНСТРУКЦИЯ
по применению дисков индикаторных картонных
с противомикробными лекарственными средствами
для определения чувствительности микроорганизмов
к антимикробным препаратам для ветеринарного применения
диск-диффузионным методом

Санкт-Петербург

2021

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель
ГК «ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ»
кандидат ветеринарных наук
Шепеткина С.В.
«18» января 2021 года



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ»
Пришко Ю.В.
«18» января 2021 года



ИНСТРУКЦИЯ
по применению дисков индикаторных картонных с противомикробными
лекарственными средствами для определения чувствительности микроорганизмов
к антимикробным препаратам для ветеринарного применения
диск-диффузионным методом

I. Назначение и область применения

- 1.1. Диски индикаторные картонные с противомикробными лекарственными средствами (далее - диски) предназначены для определения чувствительности микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания бактериальной этиологии, к антимикробным препаратам для ветеринарного применения.
- 1.2. Диски представляют собой круги из специального картона с регламентированными абсорбционными характеристиками диаметром 6 мм, имбибированные субстанцией антимикробного вещества в определенном количестве.
- 1.3. Диски выпускаются по ТУ 9388-151-39484474-2013 в пенициллиновых флаконах емкостью 10 мл, герметично закупоренных резиновыми крышками и завальцованных алюминиевыми колпачками. Во флакон с дисками помещают прослойку ваты и индикаторный силикагель.
- 1.4. На этикетке флакона указывают международное непатентованное наименование (МНН), коммерческое название антимикробного вещества, содержащегося в дисках, а также его количественное содержание в одном диске. Содержание антимикробного вещества в диске соответствует требованиям CLSI VET-A4 (Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals).
- 1.5. Один диск рассчитан на однократное использование.
- 1.6. Диски хранят при температуре 2–8°C в упаковке предприятия-изготовителя в сухом защищенном от света месте в течение всего срока годности. Допускается хранение дисков (во время транспортировки) при температуре до 25°C общей продолжительностью не более 15 дней. Вскрытый флакон с дисками хранят при температуре 2–8°C в течение всего срока годности, при условии сохранения цвета индикаторного силикагеля от светло-голубого до синего.
- 1.7. Срок годности дисков составляет от 12 до 24 месяцев (в зависимости от номенклатуры противомикробных лекарственных веществ, входящих в состав дисков) от даты изготовления, указанной на упаковке, при соблюдении условий хранения.
- 1.8. Диски могут формироваться в наборы по видовому (для антимикробных препаратов, применяемых крупному и мелкому рогатому скоту, свиньям, птице, лошадям, мелким домашним животным и др.), этиологическому и прочим признакам для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, выделенных от разных видов животных и птиц.
- 1.9. Диски (наборы дисков) комплектуют паспортами качества предприятия-изготовителя, таблицей интерпретации зон задержки роста и инструкцией по применению.

II. Способ применения

- 2.1. Исследование для определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам включает четыре этапа: приготовление питательной среды; приготовление суспензии микроорганизма и инокуляцию; аппликацию дисков на питательную среду и инкубацию; учет результатов и их интерпретацию.
- 2.2. Все работы проводятся с соблюдением условий асептики.
- 2.3. Приготовление питательной среды.
 - 2.3.1. Для оценки чувствительности бактерий с обычными питательными потребностями в качестве питательной среды используют агар Мюллера-Хинтон (МХА) без дополнительных добавок, для бактерий со сложными питательными потребностями: агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% бараньей крови для стрептококков, включая *Streptococcus pneumoniae*, для *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*; шоколадный агар Мюллера-Хинтон для *Histophilus somni* и *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Выбранную среду готовят из сухого порошка, согласно указаниям производителя, либо используют готовую среду промышленного производства.
 - 2.3.2. Среду разливают по чашкам Петри слоем толщиной $4\pm 0,5$ мм. При этом на чашку диаметром 90 мм необходимо 25 мл среды, на чашку 100 мм—30 мл среды. Перед заполнением чашек их помещают на строго горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Разлитые чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Перед использованием чашки со средой необходимо подсушить, так как при высокой влажности среды возможно формирование нечеткого края зоны подавления роста. Чашки подсушивают, выдерживая в термостате с приоткрытой крышкой при $35-37^{\circ}\text{C}$ в течение 10–30 минут, до полного высыхания поверхности среды. Нельзя пересушивать среду! Допускается хранение чашек со средой в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при $4-8^{\circ}\text{C}$ в течение 7–10 суток, однако предпочтительнее немедленное использование.
- 2.4. Приготовление суспензии микроорганизмов и инокуляция. Из агаровой культуры микроорганизма, выросшей за 18–20 часов, готовят суспензию, имеющую концентрацию $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Оптимально, бактериальная суспензия должна быть использована в течение 15 минут, но не позднее 60 минут после приготовления. Существует два способа инокуляции микроорганизмов.
 - 2.4.1. При помощи стерильных ватных тампонов. Тампон погружают в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удаляют, отжимая тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° .
 - 2.4.2. При помощи пипетки. Стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 15 минут.
- 2.5. Аппликация дисков на питательную среду и инкубация.
 - 2.5.1. Перед использованием диски достают из холодильника на 1 час, чтобы они прогрелись до комнатной температуры.
 - 2.5.2. Аппликацию дисков осуществляют не позднее, чем через 15 минут после инокуляции. Диски раскладывают с помощью пинцета, «слегка прижимая их к поверхности агара. При этом расстояние от края диска до края чашки должно быть не менее 20 мм, а между двумя дисками должно составлять около 30 мм. Таким образом, на одну чашку Петри диаметром 100 мм помещается не более 6 дисков.

- 2.5.3. Сразу после аппликации чашки Петри помещают в термостат на 16–18 ч при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$ (для тестирования метициллинрезистентных стафилококков и энтерококков инкубацию следует продлить до полных 24 часов, для стафилококков температура инкубации не должна превышать 35°C). *Streptococcus pneumoniae*, *Histophilus somni* и *Actinobacillus pleuropneumoniae* следует инкубировать в среде с $5\%\pm 2\%$ CO_2 . Если CO_2 -инкубатор недоступен, возможно использование свечного сосуда.
- 2.5.4. Учет результатов и их интерпретация.
- 2.5.5. Измерение зон подавления роста необходимо проводить с точностью до миллиметра при помощи линейки или штангенциркуля.
- 2.5.6. При измерении зон подавления роста вокруг дисков с любыми противомикробными лекарственными средствами следует ориентироваться на зону полного подавления роста микроорганизмов, определяемую невооруженным глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз. Учет результатов можно облегчить, наклонив чашку под углом 45° к рабочей поверхности.
- Измерение зон подавления роста на агаре Мюллера-Хинтон без добавок проводят в отраженном свете. Чашку Петри с закрытой крышкой располагают дном кверху над темной матовой поверхностью. Измерение зон подавления роста на агаре Мюллера-Хинтон с добавками проводят в отраженном свете. Чашку Петри помещают дном книзу, крышку снимают.
- При учете результатов определения чувствительности *Staphylococcus* и *Enterococcus* spp. к оксациллину и ванкомицину используйте проходящий свет. Обнаружение изолированных колоний внутри зоны подавления роста может рассматриваться как проявление гетерогенной метициллинрезистентности исследуемого изолята.
- 2.5.7. Интерпретация значений диаметров зон задержки роста осуществляется в соответствии с таблицами стандарта CLSI VET01-S2 и в соответствии с рекомендациями EUCAST.

III. Меры предосторожности

- 3.1. Потенциальный риск применения изделия - класс 1.
- 3.2. Диски предназначены только для диагностики *in vitro*.
- 3.3. Компоненты дисков в используемых концентрациях относятся к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007), не обладают эмбриотоксическим, тератогенным и канцерогенным действием.
- 3.4. При работе с дисками следует соблюдать «Правила работы и охраны труда в ветеринарных лабораториях» (Утверждены Министерством сельского хозяйства СССР 14 января 1975 г.)

IV. Полное наименование производителя

- 4.1. Общество с ограниченной ответственностью «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ» (НИЦФ), 192236. Россия, Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, д.30, литер А, тел./факс: (812) 327-55-81, тел: (812) 320-71-69, www.nicf.spb.ru.
Технологическое сопровождение: ГК «ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ», 191119, Россия, Санкт-Петербург, ул. Черняховского, дом 10, лит.В, оф.60, тел./факс: (812) 575-58-80, e-mail: animal-health@animal-health.ru, www.animal-health.ru
- При разработке инструкции использованы стандарты CLSI VET01-A4 (Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals (Approved Standard – Fifth Edition, • 2020) и VET01-S2, клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия-2021-01).



**ГРУППА КОМПАНИЙ
ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ**

общество с ограниченной ответственностью
191119, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Черняховского, дом 10, лит. В, оф. 60,

Тел./факс: (812) 575-58-80, e-mail: animal-health@animal-health.ru
www.animal-health.ru



**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ФАРМАКОТЕРАПИИ (НИЦФ)**

общество с ограниченной ответственностью
92236, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Белы Куна, д.30, литер А.

Тел./факс: (812) 327-55-81, тел: (812) 320-71-69
www.nicf.spb.ru

**Набор индикаторных дисков для определения чувствительности
микроорганизмов к противомикробным препаратам для животных зоопарка**

Состав набора:

- | | | |
|--|---------------------|-----------------------------------|
| 1. Азитромицин | 4. Бензилпенициллин | 9. Триметоприм и сульфаметоксазол |
| 2. Амоксициллин | 5. Гентамицин | 10. Цефтиофул |
| 3. Амоксициллин и клавулановая кислота | 6. Стрептомицин | 11. Ципрофлоксацин |
| | 7. Тетрациклин | 12. Энрофлоксацин |
| | 8. Тилозин | |

**Интерпретация значений диаметра зоны задержки роста при определении чувствительности
микроорганизмов к противомикробным препаратам для животных зоопарка
(среда Мюллера-Хинтон)**

Наименование противомикробного препарата / название микроорганизма		Зона задержки роста, мм		
		R	I	S
1. Азитромицин	В т.ч. <i>Streptococci</i> : β-гемолитическая группа, группа Viridans, <i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤13	14–17	≥18
2. Амоксициллин	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤12	13–16	≥17
	<i>Enterococcus spp.</i>	≤16	–	≥17
	<i>Staphylococcus spp.</i>	≤20	21–28	≥29
3. Амоксициллин и клавулановая кислота	Грамотрицательные микроорганизмы, <i>Enterobacteriaceae</i>	≤13	14–17	≥18
	<i>Staphylococcus spp.</i>	≤19	–	≥20
4. Бензилпенициллин	<i>Staphylococcus spp.</i>	≤28	–	≥29
	<i>Enterococcus spp.</i>	≤14	–	≥15
5. Гентамицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	≤12	13–14	≥15
	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , выделяемые от собак и лошадей; <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , выделяемая от лошадей	≤12	13–15	≥16
6. Стрептомицин	<i>Энтеробактерии</i> (по документу CLSI M100-S24 (M02-A-11))	≤11	12–14	≥15
7. Тетрациклин	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	≤14	15–18	≥19
	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤11	12–14	≥15
	Инфекции кожи и мягких тканей у собак, вызываемые <i>Staphylococcus spp.</i>	≤17	18–22	≥23
	<i>Streptococcus spp.</i> (кроме <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤18	19–22	≥23
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤24	25–27	≥28
8. Тилозин	<i>Staphylococcus spp.</i>	≤13	14–20	≥21

Наименование противомикробного препарата / название микроорганизма		Зона задержки роста, мм		
		R	I	S
9. Триметоприм и сульфаметоксазол	<i>Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp.</i>	≤10	11–15	≥16
	<i>Streptococcus spp., Streptococcus pneumoniae</i>	≤15	16–18	≥19
10. Цефтиофур	Респираторные инфекции у крупного рогатого скота, вызываемые <i>Mannheimia haemolytica, Histophilus somni</i> ; респираторные инфекции у свиней и крупного рогатого скота, вызываемые <i>Pasteurella multocida</i> ; респираторные инфекции у свиней, вызываемые <i>Actinobacillus pleuropneumoniae, Salmonella suis</i> ; маститы у крупного рогатого скота, вызываемые <i>Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis</i>	≤17	18–20	≥21
	Респираторные инфекции у лошадей, вызываемые <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	–	–	≥22
11. Ципрофлоксацин		≤15	16–20	≥21
12. Энрофлоксацин		≤17	18–21	≥22
	Инфекции кожи и мягких тканей у собак и кошек, вызываемые <i>Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., Streptococcus spp.</i> ; инфекции кожи и мягких тканей у кошек, вызываемые <i>Pseudomonas aeruginosa; Escherichia coli</i> , выделенная от птиц.	≤16	17–22	≥23
	Респираторные инфекции у крупного рогатого скота, вызываемые <i>Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Histophilus somni</i>	≤16	17–20	≥21
	респираторные инфекции у свиней, вызываемые <i>Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤18	19–22	≥23

Примечания: R – resistance – устойчивые, I – intermediate – имеющие промежуточную устойчивость, S – sensitive – чувствительные микроорганизмы. Зоны задержки роста указаны в соответствии с требованиями международного стандарта “Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, Approved Standard – 5th Edition, 2020” (CLSI VET-A4) и клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2021-01, в соответствии с рекомендациями EUCAST.