

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН
Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии

И.А. Дятлов

«___» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия

«Питательная среда для выделения синегнойной палочки сухая (ЦПХ агар)
по ТУ 20.59.52-325-78095326-2020»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Медицинское изделие «Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ агар) по ТУ 20.59.52-325-78095326-2020» предназначено для проведения бактериологических исследований с целью качественного выделения из клинического материала (испражнения, моча, кровь, мокрота, гнойное отделяемое ожоговых и хирургических ран, отделяемое глаз) бактерий рода *Pseudomonas* – возбудителей септических осложнений у ожоговых и хирургических больных.

Медицинское изделие «Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ агар) по ТУ 20.59.52-325-78095326-2020» используется в качестве вспомогательного средства диагностики инфекций, вызванных бактериями рода *Pseudomonas*, совместно с результатами других лабораторных исследований и клинической картиной пациента.

Область применения медицинского изделия «Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ агар) по ТУ 20.59.52-325-78095326-2020», далее по тексту – ЦПХ-агар - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

ЦПХ агар представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный порошок светло-желтого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов.

ЦПХ агар выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

2.1. Принцип метода

Бактериологическое исследование клинического материала с качественным видом определения бактерий рода *Pseudomonas* основано на визуальном обнаружении живых

микроорганизмов в исследуемом материале при посеве на питательную среду ЦПХ агар с последующей инкубацией в термостате при заданной температуре.

Совокупность компонентов, входящих в состав среды ЦПХ агар обеспечивает питательные потребности для роста и выделения псевдомонад. N-цетилпиридиний хлористый подавляет рост возможных бактерий ассоциантов и при этом не влияет на способность псевдомонад к росту и пигментообразованию. Комплекс антиоксидантов предотвращает окисление жирорастворимых витаминов А и Е, помогает вырабатывать больше необходимой клеткам энергии, способствует накоплению биомассы.

2.2. Состав

Питательная среда для выделения синегнойной палочки сухая (ЦПХ агар) представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

– Панкреатический гидролизат рыбной муки	20,0
– Калий серноокислый	7,6
– Магний серноокислый 7-водный	2,4
– Калий фосфорнокислый однозамещенный	1,0
– Калий фосфорнокислый двузамещенный	1,0
– Фенозан-кислота	0,025
– Бутилгидрокситолуол.....	0,075
– N-цетилпиридиний хлористый 1 водн (ЦПХ)	0,2
– Агар бактериологический	9,0±2,0
– Натрий углекислый	0,5±0,05

рН от 7,0 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 сухого ЦПХ агара 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 кипячения. Пределы значения рН, указанные выше, учитывают отклонения рН после приготовления среды.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность.

Специфическая активность ЦПХ агара оценивается по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств контрольных тест-штаммов.

ЦПХ агар обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-

штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 140 из разведения 10^{-6} через 44-48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С визуально обнаруживаемый рост колоний лимонного или зеленовато-желтого цвета, диаметром от 2,0 до 5,0 мм с окрашиванием среды вокруг колоний

3.2. Ингибирующие свойства.

ЦПХ агар полностью подавляет рост тест-штаммов *Escherichia coli* 3912/41 (O55:K59), *Proteus vulgaris* HX 19 222 из разведения 10^{-4} и *Staphylococcus aureus* Wood-46 из разведения 10^{-1} на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через 44-48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

В ходе клинических испытаний была доказана диагностическая эффективность использования МИ «Питательная среда для выделения синегнойной палочки сухая (ЦПХ агар)» по ТУ 20.59.52-325-78095326-2020 производства ФБУН ГНЦ ПМБ при проведении бактериологического исследования клинического материала, с целью выделения бактерий рода *Pseudomonas* - возбудителей септических осложнений у ожоговых и хирургических больных.

Диагностическая чувствительность культуральных исследований образцов с применением ЦПХ агара составила 98 % (по 49 положительных результатов, и по 1 ложноотрицательному результату на испытуемой среде из 50 исследованных «заведомо положительных образцов», полученных двумя независимыми испытателями). 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 ЦПХ агара - не менее 96% при доверительной вероятности 90% при нагруженности образцов не менее 10^{-6} м.кл./мл.

Диагностическая специфичность культуральных исследований образцов с применением ЦПХ агара составила 100 % (по 19 отрицательных результатов культурального исследования из 19 «заведомо отрицательных образцов», полученных двумя независимым испытателями. Рост всех тест-штаммов в концентрации 10^{-4} м.кл./мл полностью отсутствовал на испытуемой среде и среде сравнения (ЦПХ-агар, Махачкала). 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 ЦПХ агара - не менее 94% при доверительной вероятности 90%, при нагруженности образцов не менее 10^{-4} м.кл./мл.

Диагностическая эффективность культурального исследования с применением ЦПХ агара составила 98,5 % (136 правильных результата теста из 138 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 97,4% (2 ложноотрицательных результата из 100 «положительных» образцов) при условии нагруженности образцов не менее 10^{-6} м.кл./мл (положительные) и при нагруженности образцов не более 10^{-4} м.кл./мл. (отрицательные).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения медицинского изделия «Питательная среда для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар)» в соответствии с Приказом МЗ РФ № 4н от 06.6.2012 – класс 2 б.

4.2 ЦПХ агар не содержит пожароопасных и взрывоопасных веществ.

4.3 Все образцы исследуемого материала *потенциально* содержат микроорганизмы, являющиеся возбудителями инфекций, поэтому при работе необходимо соблюдать требования правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». В состав среды входит N-цетилпиридиний хлористый 1 водн (ЦПХ), поэтому необходимо использовать индивидуальные средства защиты органов дыхания и рук!

4.4 Уничтожение приготовленной питательной среды ЦПХ агара, после проведения биологического исследования образцов, осуществляется в соответствии с требованиями к уничтожению медицинских отходов, принадлежащих к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 90 мин при температуре (126 ± 2) °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").

4.5 При использовании ЦПХ агара по назначению и в соответствии с инструкцией противопоказаний к применению нет.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру 37 ± 1 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности

- Автоклав
- Пробирки стеклянные вместимостью – 10 мл
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1, 2 и 5 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Чашки Петри стерильные
- Вода дистиллированная
- Колбы, воронки стеклянные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Основной биологический материал для исследования с целью качественного выделения из клинического материала бактерий рода *Pseudomonas* – возбудителей септических осложнений у ожоговых и хирургических больных - испражнения, моча, кровь, мокрота, гнойное отделяемое ожоговых и хирургических ран, отделяемое глаз.

Синегнойная палочка относится к семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*.

Синегнойная палочка является условно-патогенным микроорганизмом, она входит в состав нормальной микрофлоры человека, но часто вызывает разнообразные гнойно-воспалительные процессы вплоть до генерализованных форм. Бактерии часто инфицируют послеожоговые раневые поверхности, рваные раны, порезы. Инфекция может развиваться в мочевыводящих путях при введении катетеров. Поражения глаз возникает при травмах и оперативных вмешательствах, часто синегнойная инфекция регистрируется при воспалении среднего уха, поражает желудочно-кишечный тракт и ногти, при проникновении в кровяное русло развивается бактериальный сепсис. Инфекции, вызываемые представителями рода *Pseudomonas*, часто имеют госпитальный характер.

6.2. Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с Методическими рекомендациями «Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки из клинического материала», М., 1984 г, МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Для проведения бактериологического исследования материал должен быть взят по возможности до назначения антибактериальных препаратов, непосредственно из очага инфекции с соблюдением правил асептики (стерильными инструментами или тампонами, в стерильную посуду) и доставлен в лабораторию в течении двух часов в термоконтейнере (без консервантов) или в течении 2 суток при условии хранения и транспортирования материала при температуре 2-8°C в специальных транспортных средах, разрешенных к применению и зарегистрированных в установленном порядке (например Транспортная среда Эймса сухая (РУ № РЗН 2018/7437 от 09.11.2020).

В случаях, когда взятие материала из очага инфекции осуществить невозможно, но он сообщается с внешней средой, производят исследование соответствующего отделяемого, например – мочи при пиелонефрите, мокроты при пневмонии, гнойного отделяемого из раневой поверхности.

Образцы, собранные *без использования консервантов*, суспендируют в ИХН (изотонический раствор хлорида натрия) в соотношении 1:5 или 1:10.

При использовании консервантов оптимальны те же сроки, но материал пригоден для исследования еще в течение 12-24 ч при условии его хранения до начала исследования при 4-6 °С. В качестве консервантов используют изготовленные в лабораторных условиях забуференный глицериновый или фосфатно-буферный консерванты (рН 8,0).

При использовании специальных *транспортных сред* для сбора и безопасного транспортирования образцов клинического материала с момента забора до начала микробиологического исследования, сохраняя жизнеспособность микроорганизмов, в то же время, препятствуя их размножению, с целью выявления предполагаемого возбудителя инфекционного заболевания: например, Транспортная среда Эймса сухая (РУ № РЗН 2018/7437 от 09.11.2020) материал пригоден для исследования в течении 2 суток.

Испражнения. Пробу, в количестве около 1 грамма отдельным наконечником с аэрозольным барьером или одноразовыми лопатками забирают из предварительно продезинфицированного горшка или подкладного судна.

Испражнения, собранные без использования консервантов, суспендируют в ИХН (изотонический раствор хлорида натрия) в соотношении 1:5 или 1:10 и высевают по 0,1 мл на каждую чашку Петри с приготовленной по п.7.1 *питательной средой* не позднее 2 часов после взятия.

При использовании любого из консервантов, перечисленных выше, материал пригоден для исследования в течение 12-24 ч при условии его хранения до начала исследования при 4-6 °С в холодильнике, или в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами, или в термосе со льдом.

Пробы, переносимые в емкость с консервантом, не должны превышать более 1/3 объема консерванта. После внесения образца в консервант, перед высевом, смесь следует перемешать.

Гной, мокроту, отделяемое ожоговых и хирургических ран отбирают с помощью стерильного шприца или ватного (марлевого) тампона, при возможности сразу засевают по 0,1 мл на каждую чашку Петри с приготовленной по п.7.1 *питательной средой* или доставляют в лабораторию в стерильных пробирках с транспортной средой (например, средой Эймса). Материал пригоден для исследования в течение 48 ч при условии его хранения в транспортной среде до начала исследования при 2-8 °С.

Мочу перед посевом центрифугируют и засевают осадок (или используют для посева нативную мочу) по 0,1 мл на каждую чашку Петри с приготовленной по п.7.1. *питательной средой*. Вне зависимости от способа получения мочи срок хранения проб можно увеличить до 24 часов при комнатной температуре или до 48 часов в холодильнике (при 2–8 °С) посредством добавления 1–2% борной кислоты сразу после сбора пробы. Замораживание мочи перед проведением микробиологических анализов недопустимо!

Кровь для исследования берут стерильным шприцом с соблюдением правил асептики из локтевой вены в объеме 2-10 мл (в зависимости от возраста пациента) или берут кровь с помощью вакуумной системы (вакутейнера), обеспечивающей правильную процедуру сбора образца и транспортировки. Образцы крови высевают по 0,1 мл на каждую чашку Петри с приготовленной по п.7.1. *питательной средой*. Образцы крови хранят при температуре 2-8°С – не более 12 часов. Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.1 Приготовление ЦПХ агара.

Навеску среды ЦПХ агар в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Не автоклавировать! Среду охладить до температуры 45-50° С и разлить в стерильные чашки Петри.

После застывания среды, чашки со средой подсушить, а затем, для подтверждения чистоты розлива, отобрать из подготовленной партии 1-2 чашки Петри со средой и выдержать в термостате при температуре 37° С в течение 24 ч, при визуальном просмотре чашек через 24 ч инкубации - бактериальный рост на чашках должен отсутствовать.

Готовая питательная среда ЦПХ агар в чашках Петри непрозрачная, светло-желтого цвета. Готовую среду можно использовать в течение 7 сут после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С.

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

7.2. После соответствующей подготовки по п. 6.2 исследуемый материал вносят на чашки Петри с ЦПХ агаром и стерильным шпателем распределяют взвесь по поверхности среды. Инкубируют при температуре (37±1)°С в течение 44-48 ч.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально через 44-48 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С. Визуально учитывают наличие и характер роста, отбирая колонии с образованием различных пигментов (сине-зеленого, зеленовато-желтого, флуоресцирующего, фиолетового, красного) или без них, диаметром от 2,0 до 5,0 мм. При обнаружении подобных колоний, при необходимости, проводят дальнейшую идентификацию выделенной культуры. При этом, необходимо учитывать, что полученные результаты не являются единственным, определяющим диагноз признаком и требуют дополнительной информации для принятия медицинского решения (например, результаты параллельных посевов на другие дифференциально-диагностические среды, идентификационные тесты), а также клинические проявления и анамнез больного).

Для получения достоверных результатов посева образцов производить не менее чем в трех повторностях.

9. ТРЕБОВАНИЯ К УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЮ

9.1 Серии ЦПХ агара, пришедшие в негодность, серии с истекшим сроком годности, а также упаковка (полиэтиленовые банки) после полного израсходования содержимого, подлежат уничтожению в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 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 ИЗДЕЛИЯ

10.1 Питательную среду для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар) необходимо хранить на складе, в герметично закрытой упаковке изготовителя, в сухом

защищенном от света месте при температуре от 2 до 30°C и относительной влажности не более 60 %.

10.2 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.

Медицинское изделие «Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ агар)» хранившееся с нарушением регламентированного режима, с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке применению не подлежит!

10.3 ЦПХ агар транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Медицинское изделие «Питательная среда для выделения синегнойной палочки, сухая (ЦПХ агар)» транспортируемое с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит!

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

Срок годности: 2 года.

Изготовитель гарантирует соответствие медицинского изделия «Питательная среда для выделения синегнойной палочки сухая (ЦПХ агар)», заявленным в ТУ 20.59.52-325-78095326-2020 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 выделения синегнойной палочки сухая (ЦПХ агар)», 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) 36-00-20, факс 36-01-16.