

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 2012 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФБУН
Государственный научный центр приклад-
ной микробиологии и биотехнологии
_____ И.А. Дятлов
« ____ » _____ 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая (далее - Питательная среда) предназначена для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом при проведении бактериологических исследований в клинической лабораторной диагностике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА

Питательная среда представляет собой смесь сухих компонентов в виде мелкодисперсного, гигроскопичного порошка желтоватого цвета.

Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

2.1. Принцип действия

Определение основано на образовании зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами чувствительными микроорганизмами и последующей регистрацией диаметров этих зон.

2.2. Состав, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки 21,0

Пептон сухой ферментативный	10,0
Натрий хлористый	3,0
Крахмал растворимый, индикатор	1,5
Агар микробиологический	12,0±3,0

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Питательная среда должна обеспечивать рост тест-штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 в виде однородного не очень плотного газона с образованием четких соответствующего диаметра зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами (см. таблицу) через 18-20 ч инкубации посевов при температуре (36±1) С в соответствии с таблицей.

Таблица - Допустимые диапазоны значений диаметров зон задержки роста тест-штаммов микроорганизмов.

№ п/п	Антибактериальные препараты (АБП)	Содержание АБП в диске	Диаметры зон задержки роста, мм		
			<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	Бензилпенициллин	10ед	29-38	_*)	-
2	Карбенициллин	100 мкг	35-42	23-29	18-25
3	Стрептомицин	30 мкг	20-25	14-22	-
4	Неомицин	30 мкг	20-27	17-22	-
5	Гентамицин	10 мкг	22-32	20-27	16-26
6	Тетрациклин	30 мкг	22-31	17-26	-
7	Эритромицин	15 мкг	22-31	8-15	-
8	Левомецетин	30 мкг	19-25	19-27	-
9	Полимиксин	300 ед	-	16-20	16-20

*) – определение с данными АБП не производят

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При анализе исследуемого материала необходимо соблюдение требований СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат, обеспечивающий температуру 35 - 37 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Диски с антибактериальными препаратами
- Пинцеты анатомические
- Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО 42-28-85 П) 10 единиц соответствующего года выпуска

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Выделенные из клинического материала чистые культуры микроорганизмов.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ проводят в соответствии с МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

7.1. Приготовление среды

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии Питательной среды, тщательно размешивают в 1л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара, разливают по колбам и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 мин. После охлаждения до 45-50°С среду разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм и по 25 мл среды в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, устанавливая их на строго горизонтальную гладкую поверхность (выверенную по уровню). Соблюдение указанных предосторожностей связано с тем, что зоны задержки роста зависят от толщины и однородности агарового слоя. При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить, соблюдая правила асептики, при температуре (36±1)°С с приоткрытой крышкой в течение 10-20 мин. Готовая среда в чашках прозрачная желтого цвета.

Готовую среду в чашках можно хранить в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4-8°С в течение 7-10 сут.

7.2 Исследование образца

7.2.1 Приготовление инокулята.

Выделенную культуру микроорганизма бактериологической петлей переносят в пробирки со стерильным 0,9% раствором натрия хлористого и доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по ОСО.

Стандартную микробную взвесь готовят путем десятикратного разведения (9,0 мл 0,9 % раствора натрия хлористого с 1,0 мл микробной взвеси) до разведения 10^{-1} . В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят новой стерильной пипеткой вместимостью 1мл.

7.2.2 Инокуляция чашек Петри со средой

Для инокуляции приготовленных чашек со средой 1,5-2,0 мл стандартной взвеси наносят на поверхность чашки Петри со средой и равномерно распределяют путем покачивания чашек. Избыток микробной взвеси удаляют стерильной пипеткой. Затем чашки подсушивают, приоткрыв крышки, при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

7.2.3 Апликация дисков и инкубация.

Не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибактериальными препаратами (АБП). Апликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. На одну чашку диаметром 90 мм помещают 4 диска с АБП, аккуратно прижав их пинцетом к поверхности среды. Чашки помещают в термостат сразу после наложения дисков и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 18-20 ч. Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации приводит к увеличению диаметра зоны подавления роста.

7.2.4 Учет результатов.

После окончания инкубации чашки помещают вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45°(учет в отраженном свете). С помощью штангенциркуля или специальной линейки измеряют диаметры зон задержки роста с точностью до 1 мм. Интерпретацию полученных результатов проводят в соответствии с МУК 4.2. 1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Питательную среду (сухую) необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С.

Срок годности – 2 года. Среда с истекшим сроком годности использованию не подлежит. В течение срока годности и начала эксплуатации питательной среды гарантируется соответствие требуемым параметрам при соблюдении условий хранения (влажность, температура, герметичность).

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

По вопросам, касающимся качества «Питательной среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам сухой» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.