

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН

«Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии»

_____ И.А. Дятлов

« ____ » _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия

Набор реагентов для бактериологических исследований

«Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения

бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* сухая»

по ТУ 20.59.52-315-78095326-2019

Медицинское изделие Набор реагентов для бактериологических исследований «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* сухая» **предназначено** для использования в качестве вспомогательного средства в клинической лабораторной диагностике с целью качественного выделения из различного клинического материала (испражнения, моча, отделяемое ожоговых и хирургических ран, гной, мокрота, в редких случаях - кровь) возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и пищевых токсикоинфекций - бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia*, а также их визуальной дифференциации по способности образовывать сероводород, далее по тексту – Набор реагентов

Область применения Набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Набор реагентов состоит из 1 банки с питательной средой и 5 флаконов с селективной добавкой (СД).

Питательная среда представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета (возможен розовый оттенок).

СД – мелкодисперсный гигроскопичный светочувствительный порошок белого цвета.

Питательная среда расфасовывается в полиэтиленовые банки по 250 г, СД - во флаконы из темного стекла по 0,011 г.

2.1. Принцип метода

Принцип бактериологического метода выделения бактерий основан на выявлении живых микроорганизмов в исследуемом материале при посеве на среду с последующей инкубацией в термостате при заданной температуре в аэробных условиях.

Пептон мясной, дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат рыбной муки, входящие в состав среды, являются источниками питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Присутствие в среде натрия тиосульфата и железа (III) лимонноаммиачного способствует образованию сероводорода, обеспечивая визуальную дифференциацию колоний протеев от морганелл и провиденсий, не образующих сероводород. Среда обеспечивает селективность в отношении грамположительной и грамотрицательной сопутствующей микрофлоры за счет присутствия в среде желчи крупного рогатого скота, кристаллического фиолетового и полимиксина В сульфата.

2.2. Состав набора

Состав питательной среды, г/л:

| | |
|---|--------------|
| Панкреатический гидролизат рыбной муки сухой (ПГРМ сухой) ... | 5,0 |
| Пептон мясной | 5,0 |
| Дрожжевой экстракт | 1,0 |
| Натрий хлористый | 4,0 |
| D(-) Маннит | 10,0 |
| D(+) Мальтоза | 10,0 |
| Желчь крупного рогатого скота очищенная, сухая | 6,0±2,5 |
| Натрия тиосульфат | 0,5 |
| Железо (III) лимонноаммиачное | 2,0 |
| Кристаллический фиолетовый | 0,003±0,0005 |
| Феноловый красный | 0,08 |
| Натрий углекислый | 0-0,3 |
| Агар бактериологический | 13,0±3,0 |

Состав СД, г/л:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Полимиксина В сульфат | 0,00075 |
| Крахмал кукурузный | 0,01025 |

рН готовой среды от 7,1 до 7,5

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 сухой питательной среды 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 стерилизации. Пределы значения рН, указанные выше, учитывают отклонения рН после стерилизации среды и внесения селективной добавки.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность.

Специфическая активность оценивается по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств контрольных тест-штаммов при росте на **питательной среде с селективной добавкой**, приготовленной по п.7.1 настоящей Инструкции.

Питательная среда обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} через 20-24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С рост не менее 30 колоний каждого тест-штамма *Providencia alcalifaciens* NCTC 1068-50, *Proteus mirabilis* 3177, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Morganella morganii* ATCC 25830 DSM 30164 в виде:

- колонии *P.alcalifaciens* NCTC 1068-50 круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета диаметром от 1,5 до 2,5 мм;
- колонии *P. mirabilis* 3177 круглые, гладкие, полупрозрачные, розовые с темным центром, диаметром от 1,0 до 2,5 мм; роение отсутствует;
- колонии *P. vulgaris* HX 19 222 круглые, гладкие, полупрозрачные, желтоватые со слабым пожелтением среды, возможно образование темного центра, диаметром от 1,0 до 2,5 мм, роение отсутствует;
- колонии *M. morganii* ATCC 25830 DSM 30164 круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета диаметром от 1,5 до 2,5 мм.

3.2. Дифференцирующие свойства. Питательная среда обеспечивает проявление признака образования сероводорода соответствующими тест-штаммами для их дифференциации.

3.3. Ингибирующие свойства

Питательная среда, приготовленная по п.7.1, подавляет рост тест-штаммов *Escherichia coli* 3912/41 (055:K59), *Staphylococcus aureus* Wood-46 ATCC 10832 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} на всех засеянных чашках через 20-24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С

Диагностическая чувствительность культуральных исследований образцов с применением **питательной среды с селективной добавкой** составила 100 % (по 34 положительных результата из 34 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 *питательной среды с селективной добавкой* - не менее 96% (при доверительной вероятности 90% при нагруженности образцов не менее 10^{-6} м.кл./мл).

Диагностическая специфичность культуральных исследований образцов с применением *питательной среды с селективной добавкой* составила 100 % (по 19 отрицательных результатов культурального исследования из 19 «заведомо отрицательных образцов», полученных двумя независимым испытателями. Рост всех «заведомо отрицательных образцов» в концентрации 10^{-4} м.кл./мл полностью отсутствовал. 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 *питательной среды с селективной добавкой* - не менее 94% (при доверительной вероятности 90%, при нагруженности образцов не более 10^{-4} м.кл./мл).

Диагностическая эффективность культурального исследования с применением *питательной среды с селективной добавкой* - 100 % (по 53 правильных результата теста из 53 исследованных заведомо отрицательных и положительных образцов), полученных двумя независимыми испытателями.

Прогностичность положительного и отрицательного результата культурального исследования - 100% (ложноположительных и ложноотрицательных результатов не выявлено) 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 Набора реагентов в соответствии с Приказом МЗ РФ № 4н от 06.6.2012 – класс 2 б.

4.2 Набор реагентов 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».

4.4 Набор реагентов содержит селективную добавку с антибиотиком, поэтому при работе с набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты органов дыхания и рук!

4.5. Уничтожение приготовленной питательной *питательной среды с селективной добавкой* после проведения биологического исследования образцов осуществляется по 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", как уничтожение медицинских отходов, принадлежащих к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 90 мин при температуре (126 ± 2) °С.

4.6 При использовании Набора реагентов 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 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Чашки Петри стерильные
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные
- Транспортные среды (для сбора и безопасного транспортирования образцов клинического материала с момента забора до начала микробиологического исследования), например, Транспортная среда Эймса сухая (РУ № РЗН 2018/7437 от 09.11.2020)

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Бактерии родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Важную роль в специфической патологии человека, особенно в качестве возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и пищевых токсикоинфекций, играют два вида: *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, причем *P. mirabilis* вызывает 75—90% инфекций человека.

Протей вызывает у человека различные заболевания, чаще протекающие по типу

пищевой токсикоинфекции. В ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами протей вызывает различные формы гнойно-воспалительных и септических заболеваний: цистит, пиелит, гнойные осложнения ран и ожоговых поверхностей, флегмоны, абсцессы, плеврит, пневмонию, остеомиелит, менингит, сепсис. Патогенез пищевой токсикоинфекции связан с массовым разрушением протей в желудочно-кишечном тракте и всасыванием в кровь освобождающегося при этом эндотоксина.

6.1. Для лабораторной диагностики протей используется бактериологический метод, предусматривающий качественное установление наличия патогенных бактерий в исследуемом образце клинического материала.

Материалом для посева являются клинические образцы: испражнения, моча, отделяемое ожоговых и хирургических ран, гной, мокрота, в редких случаях - кровь. Преаналитический этап включает сбор проб, их маркировку, доставку в лабораторию, регистрацию поступившего материала и, при необходимости, его подготовку для проведения исследований.

6.2. Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с МУ 04-723/3 «Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями» (М., 1984 г), МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Общим требованием к процедуре отбора проб клинических материалов является обеспечение условий, исключающих контаминацию (загрязнение) материала. Материал для бактериологического исследования целесообразно брать до начала антибиотико-(химио)-терапии. Емкости для сбора образцов должны быть тщательно вымыты и лишены следов дезинфицирующих средств.

Образцы, собранные *без использования консервантов*, суспендируют в ИХН (изотонический раствор хлорида натрия) в соотношении 1:5 или 1:10 и высевают на приготовленную по п.7.1. *питательную среду с селективной добавкой* не позднее 2 часов после взятия.

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, фосфатно-буферный консерванты (рН 8,0), или специальные транспортные среды 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)

Испражнения. Пробу, в количестве около 1 грамма отдельным наконечником с аэро-

зольным 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 на приготовленную по п.7.1. *питательную среду с селективной добавкой* 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, отделяемое ран , мокроту отбирают с помощью стерильного шприца или ватного (марлевого) тампона, при возможности сразу засевают на приготовленную по п.7.1. *питательную среду с селективной добавкой* 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. 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 хранят при температуре 2-8°С – не более 12 часов. Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Для получения информации о потенциально патогенных бактериях родов протей, провиденции и морганелл - возбудителях внутрибольничных инфекций исследованию подлежат смывы с поверхностей внутрибольничного оборудования, медицинского инструментария, рук и одежды персонала.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.1. Приготовление питательной среды с селективной добавкой.

Навеску питательной среды в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2 мин до полного расплавления агара. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин.

Вскрыть флакон с селективной добавкой и растворить содержимое флакона в 5 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешать в течение 1 мин, внести в стерильную, охлажденную до температуры 50-55 °С питательную среду из расчета 5 мл раствора СД на 1 л среды и разлить в стерильные чашки Петри. После застывания среды чашки подсушить. Раствор СД хранению не подлежит, использовать в день приготовления.

Готовая питательная среда прозрачная красного цвета. Готовую питательную среду можно использовать в течение 14 сут после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С.

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

7.2. После доставки образцов в лабораторию и соответствующей подготовки по п. 6.2, *исследуемый материал внести по 0,1 мл* на чашки Петри с питательной средой, приготовленной по п.7.1. и стерильным шпателем распределить взвесь по поверхности среды. Инкубировать при температуре (37±1)°С в течение 20-24 ч.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально через 20-24 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Визуально учитывают наличие роста колоний, с характерной для протеев морфологией (см п.3.1, 3.2. настоящей Инструкции).

При обнаружении подобных колоний проводят дальнейшую идентификацию выделенной культуры. При этом, необходимо учитывать, что полученные результаты не являются единственным признаком, определяющим диагноз 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 Набора реагентов, пришедшие в негодность, серии с истекшим сроком годности, подлежат уничтожению в соответствии с 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. Упаковка (полиэтиленовые банки, флаконы) после полного израсходования содержимого, подлежит утилизации в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А».

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 Набор реагентов хранят на складе в герметично закрытой упаковке производителя:

- банку с питательной средой - в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30°C и относительной влажности не более 60 %;
- коробку с флаконами СД - в холодильнике при температуре от 2 до 8°C.

10.2 После вскрытия банку с питательной средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30°C, избегая попадания влаги; флакон с СД после вскрытия и приготовления раствора хранению не подлежит, раствор используется в день приготовления.

Медицинское изделие - Набор реагентов для бактериологических исследований «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* сухая» по ТУ 20.59.52-315-78095326-2019, хранившееся с нарушением регламентированного режима, с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке применению не подлежит!

10.3 Набор реагентов транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 3 суток.

Медицинское изделие - Набор реагентов для бактериологических исследований «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* сухая» по ТУ 20.59.52-315-78095326-2019 транспортируемое с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит!

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

Срок годности Набора реагентов - 2 года.

Изготовитель гарантирует соответствие медицинского изделия - Набор реагентов для бактериологических исследований «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* сухая» заявленным в ТУ 20.59.52-315-78095326-2019 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования их в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения.

По всем вопросам, касающимся качества медицинского изделия - Набор реагентов для бактериологических исследований «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* сухая» по ТУ 20.59.52-315-78095326-2019, получения консультации и поддержки обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-10, факс 36-01-20.