

**Инструкция по применению**

**индикаторных дисков для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам для ветеринарного применения**

**диско-диффузионным методом.**

1. **Назначение и область применения:**
	1. Индикаторные диски предназначены для определения чувствительности микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания животных бактериальной и грибковой этиологии, к противомикробным препаратам, применяемым в ветеринарии.
	2. Индикаторный диск представляет собой круглый картонный диск диаметром 6±0,2мм, пропитанный субстанцией антимикробного препарата.
	3. Изготавливаются из картона фильтровального технического (ГОСТ 6722-75) и субстанции антимикробного вещества, предназначенной для производства конкретного наименования антимикробного препарата для ветеринарного применения по ТУ 9398-006-01967164-2009 в соответствии с международным стандартом SLCI (*Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals* (Approved Standard – Third Edition, 2013).
	4. Индикаторные диски выпускаются в пенициллиновых флаконах емкостью 10 мл, плотно укупоренных резиновой крышкой и закрытыми алюминиевым колпачком. Во флакон с индикаторными дисками вкладывается прослойка ваты, соответствующая ГОСТ 5556-81 «Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия», и индикаторный силикагель, соответствующий ГОСТ 8984-75 «Силикагель-индикатор. Технические условия».
	5. В одном флаконе содержится 100±5 шт. индикаторных дисков с определенным антимикробным препаратом.
	6. Каждому наименованию индикаторного диска присваивается коммерческое название антимикробного препарата с обязательным указанием концентрации антимикробного вещества в одном индикаторном диске.
	7. Удельная активность антимикробного соединения в диске соответствует требованиям МУК 4.2.1980-04 МЗСР РФ, 2004 г.
	8. Один диск рассчитан на проведение одного исследования.
	9. Индикаторные диски формируются в наборы для определения чувствительности микроорганизмов, выделенных от разных видов животных (крупный рогатый скот, свиньи) и птиц. В комплектацию набора входит перечень индикаторных дисков, аналитические паспорта на каждое наименование, таблица для интерпретации зон задержки роста и инструкция по применению.
	10. Индикаторные диски следует хранить при температуре +2+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 дней. Вскрытый флакон с дисками можно хранить при температуре +2+8°С в течение всего срока годности набора, при условии сохранения цвета индикаторного силикагеля от светло-голубого до синего.
	11. Срок годности составляет 12 месяцев с даты изготовления, указанной на упаковке при соблюдении условий хранения.
2. **Меры предосторожности**
	1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.
	2. Набор дисков предназначен только для диагностики in vitro.
	3. Компоненты набора в используемых концентрациях относятся к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007), не обладают эмбриотоксическим, тератогенным и канцерогенным действием.
	4. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).
3. С**пособ применения:**

Исследование для определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам необходимо провести исследование, включает четыре этапа: приготовление питательной среды; приготовление суспензии микроорганизма и инокулящия; аппликация дисков на питательную среду и инкубация; учет результатов и их интерпретация.

* 1. **Приготовление питательной среды**

Для оценки чувствительности бактерий с обычными питательными потребностями используют агар Мюллера-Хинтона (MХА) без дополнительных добавок. Для бактерий со сложными питательными потребностями используют агар Мюллера-Хинтона с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-NAD (МХА-П). Можно применять сухую питательную среду АГВ, однако желательно проводить контроль ее качества.

Выбранную среду готовят из сухого порошка, согласно указаниям производителя, либо используют готовые питательные среды.

Агар разливают по чашкам Петри слоем толщиной 4±0,5 мм. При этом на чашку диаметром 90 мм необходимо 20 мл среды, на чашку 100 мм – 25 мл среды.

Перед заполнением чашек их ставят на строго горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Заполненные чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Допускается хранение сред в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4-8°С в течение 7-10 суток, однако предпочтительнее немедленное использование. Перед использованием агар необходимо немного подсушить инкубацией с приоткрытой крышкой при 35-37 ̊С в течение 10-20 минут.

* 1. **Приготовление суспензии микроорганизмов и инокуляция.**

Из бульонной или агаровой культуры микроорганизма, выросшей за 18-20 часов, готовят суспензию, имеющую концентрацию 1,5\*108 КОЕ/мл, что измеряется визуально при помощи стандарта мутности 0,5 по МакФарланду.

Существует два способа инокуляции микроорганизмов:

1. Использование стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Для абсорбции инокулята чашку оставляют при комнатной температуре от 3-5 до 10-15 минут (но не более).
2. 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.
3. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 15 минут для абсорбции инокулята.
	1. **Аппликация дисков на питательную среду и инкубация.**

Перед использованием диски следует достать из холодильника на 1 час, чтобы они нагрелись до комнатной температуры.

Аппликация дисков осуществляется не позднее, чем через 15 минут после инокуляции. Раскладывают диски 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.

Сразу после аппликации чашки Петри помещают в термостат на 18-24 ч при температуре 35 ̊С.

* 1. **Учет результатов и их интерпретация**

Чашки Петри после инкубации помещают на темную матовую поверхность кверху дном так, чтобы свет падал под углом 45 ̊. Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм, включая диаметр самого диска, при этом не обращают внимания на очень мелкие колонии, выросшие в зоне задержки роста. Исключение – определение чувствительности стафилококка с оксациллину.

При нерезко очерченных краях зон или зонах с двойными контурами следует измерять диметры по наиболее четкому контуру, игнорируя мелкие колонии или едва заметный газон у края зоны. При наличии больших колоний по периферии зоны граница ее определяется местоположением внутреннего края этой группы колоний.

Если крупные колонии распределены по всей зоне, культуру следует проверить на однородность, а испытания повторить. Наличие таких колоний при отсутствии загрязнения инокулята позволяет предположить наличие гетерорезистентной популяции.

Инструкция разработана ГК ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ и ЗАО НИЦФ.

При разработке инструкции использованы клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия-2015-02, утверждены на расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (Москва, 22.05.2015 г.); ТУ 9398-006-01967164-2009, МУК 4.2.1980-04



Организатор производства индикаторных дисков для определения чувствительности к антимикробным препаратам для ветеринарного применения – **ООО «ГК ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ»** (191119, Россия, ул.Черняховского, д.10, лит.А, оф.33, тел. (812) 575-55-80, (812\_ 575-55-86, e-mail: animal.health.77@gmail.com, [www.animal-health.ru](http://www.animal-health.ru) ).



 Компания – производитель: **ЗАО НИЦФ** (192236, Россия, Санкт-Петербург, ул. Белы Куна,д. 30, лит. А, офис 400, www.nicf.spb.ru)