

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения
Республики Беларусь
Б.Н. Андросюк
«02» 06 2020г.



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по НИР ВГМУ
С.А. Сушков
2020г.



ТЕСТ-СИСТЕМА «АБ-СТРБ» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
АНТИБИОТИКАМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СТРЕПТОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ С УЧЕТОМ
СПОСОБНОСТИ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКУ

инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
ДИРЕКТОР
РУП «Центр экспертиз и
испытаний в здравоохранении»
С.И. Марченко
«01» 06 2020



СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Городская инфекционная
клиническая больница», г. Минска.
Н.Н. Юровский
«05» 06 2020



СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Пинская центральная
больница»
О.Н. Головки
«05» 06 2020



СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Брестский
областной ЦГЭиОЗ»
Е.В. Ильяшева
«11» 05 2020



Минск 2020

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «АБ-СТРБ» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СТРЕПТОКОККОВ, ОБРАЗУЮЩИХ БИОПЛЕНКУ

Тест-система «АБ-СТРБ» для определения чувствительности стрептококков, образующих биопленку однократного использования служит для определения чувствительности стрептококков и энтерококков к антибиотикам в полужидкой среде после 18-24 ч инкубации. Учёт чувствительности возможен визуально или инструментально с помощью анализатора иммуноферментного Ф300ТП и компьютера с программным обеспечением «bactoSTREP».

В культуральную среду добавляется бактериальная взвесь, которые затем вносятся в лунки планшета, содержащего лиофильно высушенные антибиотики. После инкубации производится визуальный или инструментальный учёт. Резистентные штаммы растут в лунке, делая среду непрозрачной, а если штамм чувствителен к антибиотику – среда остаётся прозрачной.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Тест-система «АБ-СТРБ» для определения чувствительности стрептококков, образующих биопленку предназначена для определения чувствительности к антибиотикам возбудителей стрептококковой инфекции с учетом способности формировать биопленку.

Область применения тест-системы – клиническая медицина.

2 СОСТАВ НАБОРА

2.1 Компоненты тест-системы «АБ-СТРБ» для определения чувствительности стрептококков, образующих биопленку:

96-луночный плоскодонный планшет – 2 шт;

Среда АБС для культивирования стрептококков объемом (4±0,1) мл – 8 флаконов;

Стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9%, (5±0,1) мл 8 флаконов (ампул);

Наконечники полипропиленовые стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл – 8 шт;

2.2 Планшет №1 содержит 96 лунок (12 колонок и 8 рядов, по 2 ряда - 24 лунки для определения чувствительности одного штамма микроорганизма). Всего планшет позволяет определять чувствительность к 19 антибиотикам четырех штаммов микроорганизмов. Последняя лунка каждого четного ряда не содержит антибиотика и служит для определения положительного контрольного роста. Первые две лунки каждого нечетного ряда отведены для определения способности формировать биопленку исследуемым микроорганизмом, а первые две лунки каждого четного отведены для отрицательного контроля образования биопленки. Остальные 19 лунок содержат антибиотики. Планшет №2 служит для определения чувствительности микроорганизма в составе биопленки к 6 антибиотикам, расположенным в первых лунках каждого нечетного ряда. Последняя лунка каждого нечетного ряда не содержит антибиотика и служит для определения положительного контрольного роста. В случае если исследуемый изолят микроорганизма обладает способностью образовывать биопленку, для определения чувствительности бактерии в составе биопленки используется планшет №2.

2.3 Концентрации антибиотиков в лунках планшета №1 и №2 (в мг/л после внесения питательной среды) представлены в таблице Б.1

Таблица 1 – Концентрации антибиотиков в лунках планшета (в мг/л после внесения питательной среды)

Тест-система «АБ-СТРБ» №1

Расположение антибиотиков:	Номер лунки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
- А, С, Е, G	БП +	БП +	Бен +	Амп Е -	Ам+К +	Ам+С +	Ими +	Мер +	СтрЕ -	ГенЕ -	АмиЕ -	Цип +
- В, D, F, H	КБП -	КБП -	Лев Е +	Мок -	ТетЕ -	ТигЕ -	ВанЕ -	ФосЕ +	ХлоЕ +	ЭриЕ +	Лин +	К +

Тест-система «АБ-СТРБ» №2

Расположение антибиотиков:	Номер лунки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
- А, С, Е, G	Мок +	ЛевЕ +	Цип +	ТигЕ -	Лин +	ФосЕ +						К +

Примечание:

БП – биоплёнка;

КБП – контроль биоплёнки (знак «-» означает – отсутствие образование биоплёнки в лунке);

К – положительный контроль;

знак «+» означает – наличие роста в лунке;

знак «-» означает – отсутствие роста в лунке;

Е – обозначение после названия антибиотика – определение чувствительности проводится только для энтерококков.

Сокращённые названия антибиотиков с концентрациями и примечаниями по определению устойчивости представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активные ингредиенты тестов для тест-системы «АБ-СТРБ» №1 для определения чувствительности к антибиотикам стрептококков и их способности формировать биопленку.

Тест-система «АБ-СТРБ» №1

Название антибиотика	Сокращенное обозначение	Активные ингредиенты	Кол-во мг/л
Биопленка	БП	-	-
Биопленка	БП	-	-
Контроль биопленки (Б)	КБП	-	-
Контроль биопленки (Б)	КБП	-	-
Амикацин Е (164)	Ами	Амикацин Е	164
Амоксициллин+Клавуланат (0,5)	Ам+К	Амоксициллин+Клавуланат	0,5
Ампициллин Е (8)	Амп	Ампициллин Е	8
Ампициллин+Сульбактам (0,5)	Ам+С	Ампициллин+Сульбактам	0,5
Бензилпенициллин (0,25)	Бен	Бензилпенициллин	0,25
Ванкомицин Е (2)	ВанЕ	Ванкомицин Е	2
Гентамицин Е (128)	ГенЕ	Гентамицин Е	128
Имипенем (2)	Ими	Имипенем	2
Левофлоксацин Е (2)	ЛевЕ	Левофлоксацин Е	2
Линезолид (4)	Лин	Линезолид	4
Меропенем (2)	Мер	Меропенем	2
Моксифлоксацин (0,5)	Мок	Моксифлоксацин	0,5
Стрептомицин Е (512)	СтрЕ	Стрептомицин Е	512
Тетрациклин Е (4)	ТетЕ	Тетрациклин Е	4
Тигециклин Е (4)	ТигЕ	Тигециклин Е	4
Фосфомицин Е (4)	ФосЕ	Фосфомицин Е	4
Хлорамфеникол Е (8)	ХлоЕ	Хлорамфеникол Е	8
Ципрофлоксацин (0,5)	Цип	Ципрофлоксацин	0,5
Эритромицин Е (0,5)	ЭриЕ	Эритромицин Е	0,5

Тест-система «АБ-СТРБ» №2

Название антибиотика	Сокращенное обозначение	Активные ингредиенты	Кол-во мг/л
Моксифлоксацин (2)	Мок	Моксифлоксацин	2
Левофлоксацин Е (2)	ЛевЕ	Левофлоксацин Е	2
Ципрофлоксацин (2)	Цип	Ципрофлоксацин	2
Тигециклин Е (0,5)	ТигЕ	Тигециклин Е	0,5
Линезолид (4)	Лин	Линезолид	4
Фосфомицин Е (4)	ФосЕ	Фосфомицин Е	4
Контроль	К	-	-

3 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

3.1 Флаконы со средой и планшеты должны быть выдержаны при температуре от 18 до 30°C 20 минут.

3.2 Работа с планшетом должна проводиться в стерильном боксе после 30 минут обработки ультрафиолетовым облучением.

3.3 Необходимое лабораторное оборудование:

- холодильник;
- термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до температуры 37,6°C с ценой деления 0,1°C;
- спиртовая или газовая горелка;
- дозаторы автоматические с погрешностью 1 % объёмом от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл;
- денситометр или стандартный образец оптической плотности 0,5 оптических единиц *McFarland*;
- анализатор иммуоферментный АИФ М/340;
- программное обеспечение «bactoSTREP»;
- IBM совместимый компьютер;
- ультразвуковой генератор УЗГ55-22 или аналог.

4 МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ

4.1 Приготовить взвесь бактерий.

Для этого бактериологической петлей внести одну или более колоний бактерий, выращенных в течение 18-48 ч при 37°C на среде для стрептококков, в ампулу с 5+0,1 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в пробирке после внесения микроорганизма должна соответствовать 0,5 оптическим единицам *McFarland*.

Этого можно достичь путем:

- измерения на денситометре – 0,5 *McFarland* (составляет $7,5 \times 10^7$ КОЕ/мл);
- сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 *McFarland*;

4.3 Перенести в ампулу с питательной АБС средой для культивирования стрептококков (рекомендуется выдержать 25 минут в термостате при 37°C) 200 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешать.

4.4 Внести в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБС для культивирования стрептококков с микроорганизмами ($3,0 \times 10^6$ КОЕ/мл).

4.5 Планшет накрыть крышкой. Инкубировать 18-24 ч при 37°C в термостате в капнофильных условиях (5-10% CO₂).

4.6 Индикация биоупленки проводится с использованием раствора кристаллического фиолетового после инкубации. Фиксируют микробный матрикс в первых двух лунках каждого нечетно и четного ряда путем добавления в них по 160 мкл 2,5 % раствора глутаральдегида при экспозиции в 5 минут. Следующим этапом четырехкратно отмывают с помощью автоматической мойки или вручную, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. В лунки планшета вносят по 180 мкл 0,25 % раствора кристаллического фиолетового на 5 минут, после чего планшет снова четырехкратно отмывают, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушивают в течение 10 минут. Для экстракции раствора красителя из клеток в лунки добавляют по 200 мкл 33 % раствор уксусной кислоты при экспозиции 10 минут.

4.7 Для определения чувствительности к антибиотикам стрептококков способных формировать биоупленку используют планшет №2. Для получения микробного матрикса используют контрольные лунки планшета №1. Из данных лунок планшета с помощью стерильной пипетки удаляют взвесь планктонных форм бактерий. Лунки промывают четырехкратно дистиллированной водой. На стенках лунок остается сформированная биоупленка. В лунки планшета с биоупленкой добавляют по 150 мкл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%, помещают соответствующий по размеру и форме лунке планшета наконечник ультразвукового генератора УЗГ55-22, включают аппарат в режиме III на 90 секунд и обрабатывают последовательно каждую лунку. Далее стандартизируют полученную взвесь микроорганизмов и готовят разведение на среде АБС как описано выше для планшета №1. В планшет № 2 согласно расположению антибиотиков и контрольных лунок в таблице Б.2 добавляют по 135 мкл питательной среды АБС с микроорганизмами в форме биоупленки и инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов в капнофильных условиях.

5 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1 Резистентные штаммы растут в лунке, делая среду непрозрачной, а если штамм чувствителен к антибиотику – среда остаётся прозрачной.

5.2 При отсутствии роста в контрольной лунке – тест считается недействительным, и его необходимо повторить.

5.3 Визуальный учет чувствительности к антибиотикам рекомендуется проводить на черном фоне

Визуальный учет		Результат	Исследуемые штаммы	
○	прозрачная	-	Ч (S)	Чувствительный
●	мутная	+	Р (R)	Резистентный

5.4 Инструментальный учет чувствительности к антибиотикам планшетов №1 и №2 производится с помощью многоканального спектрофотометра Ф300 на длине волны 620 нм и компьютера с программным обеспечением «bactoSTREP». Положительным считается результат при оптической плотности $\geq 0,23$ OD, отрицательным $< 0,13$ OD. «Серая зона» располагается в интервале $< 0,23 - \geq 0,13$ – тест считается спорным и требует для учёта визуального подтверждения. При отсутствии роста в контрольной лунке – тест считается недействительным, и его необходимо повторить.

5.5 Определение количества образованной биопленки проводится программой автоматически. В случае превышения концентрации микробного матрикса для исследуемого изолята $> 4 \pm 1$ мкг/лунку, штамм считается образующим биопленку и для определения его чувствительности к антибиотикам необходимо воспользоваться планшетом №2.

6 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

6.1 Тест-система должна храниться при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ на протяжении всего срока годности.

6.2 Флаконы со средой и планшеты перед постановкой опыта должны быть выдержаны при температуре $30-37^\circ\text{C}$ 25 минут.

6.3 Для исследования необходимо использовать только 18-24 ч культуру микроорганизма.

6.4 Количество вносимого инокулята должно быть стандартным. Поэтому обязательно пользоваться денситометр или стандарт оптической плотности.

6.5 Для отбора и добавления реагентов необходимо использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

6.6 Инкубация планшета должна производиться в температурном режиме $35 - 37^\circ\text{C}$. При повышении или понижении температуры возможен некорректный результат.

6.6.7 Большое количество пузырьков в культуральной среде может изменить результаты автоматического учёта чувствительности.

6.8 Собранный материал и бактериальные культуры следует считать потенциально опасными, что требует опытного и квалифицированного обращения. После использования все планшеты, флаконы и наконечники должны быть простерилизованы в паровом стерилизаторе при температуре $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ давления $(0,11 \pm 0,02)$ мПа $(1,1 \pm 0,2)$ кгс/см² в течении (45 ± 3) мин, сожжены или дезинфицированы погружением в раствор хлорамина Б с массовой долей 0,5 % с экспозицией 30 мин.

6.9 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

7 ФОРМА ВЫПУСКА

7.1 Компоненты тест-системы в виде комплекта, включающего 2 планшета с антибиотиками и силикагелем, 8 флаконов питательной среды культивирования стрептококков $(4 \pm 0,1)$ мл, 8 флаконов стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9 % $(5 \pm 0,1)$ мл, 8 наконечников стерильных для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл и инструкция по применению, помещаются в коробку из картона коробочного.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

8.1 Хранение тест-системы должно производиться при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ на протяжении всего срока годности.

8.2 Транспортирование тест-системы осуществлять при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в сухих, чистых, крытых транспортных средствах (ГОСТ 17768).

8.3 Срок годности тест-системы - 12 месяцев с даты изготовления.

8.4 При нарушении условий хранения, транспортирования и схемы постановки опыта рекламации не принимаются.

В остальных случаях рекламации на качество тест-системы направляются по адресу изготовителя: 21009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Тел/факс +375212-64-81-57.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».