

ОБЩИЕ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Готовые к использованию и частично заполненные питательные среды

В этом документе описана структура документов **Инструкций по применению**, а также приведена дополнительная информация по работе с готовыми к использованию и частично заполненными питательными средами **BD**.

Дополнительная информация, не предоставленная в отдельных документах Инструкций по применению, приведена в этом документе в виде текстовых блоков.

Заголовок на странице 1 всех документов содержит знак соответствия европейским стандартам (**CE**), если продукт получил знак соответствия **IVD** согласно директиве European IVD Directive¹ (Европейская директива в отношении диагностики in vitro), **номер документа и версию** (например, PA-123456.01 для питательных сред в чашках и BA-123456.01 для питательных сред во флаконах), а также дату последнего **пересмотра** (дата и год). Номер документа и версия приведены также в **нижнем колонтитуле** на каждой странице.

Далее приведено **название продукта**. Некоторые документы **Инструкций по применению** содержат описание нескольких питательных сред с похожим составом и сферой применения.

НАЗНАЧЕНИЕ

Указывается область применения. При использовании не по прямому назначению питательная среда и процедура должны быть утверждены пользователем.

BD Diagnostic Systems не несет никакой ответственности, если используются методы посева, микроорганизмы или процедуры, не рекомендованные в Инструкциях по применению.

ПРИНЦИПЫ И ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

В этом разделе указывается микробиологическая методика. Кроме того, приводится история разработки питательной среды, описание процедуры и функции отдельных ингредиентов (см. пункт **РЕАГЕНТЫ**).

РЕАГЕНТЫ

В этом разделе приведена рецептура и водородный показатель (pH) продукта.

В таблице с рецептурой количества ингредиентов (г, мг, мкг, мл, МЕ, Е) приводятся только один раз, а в дальнейшем только в том случае, если значение изменено. Далее приведен пример:

BD CHROMagar O157

Рецептура* на литр очищенной воды

Хромопептон	22,0 г	
Натрия хлорид	5,0	← кол-во в [г]
Калия теллурит	2,5 мг	
Цефиксим	0,05	← кол-во в [мг]
Цефсулодин	4,0	← кол-во в [мг]
Специальная хромогенная избирательная смесь	1,0 г	
Агар	12,0	← кол-во в [г]

pH: 7,1 +/- 0,2

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Если готовая к использованию или частично заполненная питательная среда **BD** помечена знаком **IVD**, это означает, что среда предназначена для диагностики in vitro и прошла проверку соответствия директиве European In Vitro Diagnostic Device Directive¹ (Европейская директива в отношении диагностики in vitro). Если среду можно использовать в других областях микробиологии, это специально оговаривается.

Продукты предназначены для профессионального применения и должны использоваться только персоналом, прошедшим специальное обучение. Продукты не должны использоваться пациентами для самодиагностики.

Если продукт помечен знаком «For Laboratory Use» (Только для лабораторного использования), то он предназначен только для использования в сфере промышленной микробиологии, общей микробиологии и общей гигиены и не должен использоваться для обработки человеческих образцов.

Не используйте продукт при наличии признаков бактериального заражения, изменения цвета, высыхания или других признаков разложения.

Работая с образцами и питательными средами, соблюдайте правила асептики до, во время и после посева образца.

Биологическая и химическая безопасность продукта

В этом разделе может содержаться дополнительная информация о химической и биологической опасности. Предупреждения сопровождаются соответствующими символами и специальными фразами, обозначенными буквами R (риск) и S (безопасность)².

Потенциально опасные животные материалы получены **BD** в Австралии, Новой Зеландии и США. Ни в одной из этих стран не наблюдалось случаев коровьей губчатой энцефалопатии (КГЭ). **BD** также получает животные материалы из других стран (например, из Аргентины, Бразилии, Колумбии, Мексики, ЮАР или Уругвая). Ни в одной из этих стран не наблюдалось случаев КГЭ.

Биологическая опасность образцов и микроорганизмов, культивированных на микробиологических питательных средах

Соблюдайте меры предосторожности в отношении микробиологических материалов, принятые в вашем учреждении. Работа с образцами и культурами микроорганизмов должна производиться в соответствии с региональными нормативными актами и правилами биологической безопасности. В соответствии с европейской директивой 2000/54/EC, большая часть патогенных грибов и бактерий внесена в группу риска 2. В группу риска 3** входит *Salmonella Typhi*, энтерогеморрагическая *Escherichia coli* (EHEC, *enterohemorrhagic Escherichia coli*, или шиго-токсин-продуцирующая *E. coli*, STEC, *shiga toxin-producing E. coli*), *Shigella dysenteriae* (тип 1), а также несколько других бактерий и грибов. Также в группу риска 3 включены все виды *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* и *Histoplasma capsulatum*. Дополнительные сведения см. в Приложении III к директиве 2000/54/EC³. С этой и другими европейскими директивами можно ознакомиться, пройдя по ссылке <http://europa.eu.int/eur-lex>

Утилизация продукта

После использования и до выбрасывания контейнеры с образцами и все загрязненные материалы, включая питательную среду и контейнеры с загрязненной средой, нужно обработать в автоклаве в течение 20–30 минут при температуре 121°C или выше (если стерилизуется большой объем материалов) либо сжечь, соблюдая утвержденную в учреждении методику.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

Готовые к использованию питательные среды **BD** в чашках должны храниться при температуре от +2 до +8°C. Питательные среды во флаконах и погружные пластинки для анализа можно хранить в других условиях.

Кроме **Инструкций по применению**, температура хранения также указывается на упаковочной этикетке или коробке с продуктом.

Следует избегать замораживания и перегрева.

Замораживание может привести к разрушению агарового геля или выпадению осадка в жидких питательных средах. Длительное хранение при температуре, превышающей указанную, может привести к разрушению ингредиентов питательной среды. Это в особенности касается избирательных агентов, таких как антимикробные препараты. Резкая смена температуры (например, с 2°С до 25°С и обратно до 2°С) может привести к конденсации жидкости на плотной питательной среде ввиду повышения влажности воздуха. Питательные среды в чашках нужно высушить перед посевом (например, поместить, приоткрыв крышку, в чистый инкубатор, разогретый до 30–37°С, не больше чем на час). Не вытирайте поверхность питательной среды вручную! Точное время высушивания зависит от влажности воздуха в инкубаторе.

В инструкции также приведены условия хранения открытой упаковки.

Открытую упаковку чашек с питательной средой нужно хранить в охлаждаемом чистом помещении.

Во время хранения нужно соблюдать меры предосторожности, чтобы не загрязнить среду (например, запаковать чашки в чистые пластиковые пакеты).

Срок хранения закрытых флаконов с питательными средами, извлеченными из упаковки, указан на упаковочной этикетке флакона.

Все готовые к использованию и частично заполненные питательные среды нужно хранить в темноте.

При длительном воздействии искусственного освещения, солнечных лучей или УФ-излучения качество питательной среды может заметно снизиться. Некоторые питательные среды, например хромогенная среда, агар Эндо и др., особенно чувствительны к освещению (до и после инкубации).

Все готовые к использованию или частично заполненные питательные среды должны быть использованы **до истечения срока годности** и выдерживаться в течение рекомендуемого инкубационного периода.

В качестве примера можно привести посев на среду для микобактерий в день истечения срока годности с последующей 4–6-недельной инкубацией. Не высушивайте среды во время инкубации. Дата истечения срока годности (символ песочных часов) указана на каждом контейнере, а также на упаковочной этикетке. Для всех продуктов используется формат «год-месяц-день», например, 2004-06-09 означает 9 июня 2004 г.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Процедуры контроля качества, описанные в **Инструкциях по применению**, должны выполняться пользователем. Тестовые штаммы, указанные в инструкции, обычно (но не всегда) соответствуют штаммам, использованным в процедурах контроля качества при заводском тестировании, проводимом изготовителем (это тестирование могло также включать дополнительные контрольные штаммы). Чаще всего используются штаммы из

коллекции American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org), но также могут использоваться штаммы из европейских коллекций, например Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; www.dsmz.de) или National Collection of Type Cultures (NCTC; www.hpacultures.org.uk).

Использованные тестовые штаммы и результаты тестирования см. в Сертификате анализа соответствующего продукта.

Процедуры тестирования эффективности микробиологической среды зависят от типа среды и последующих методов обработки.

Всегда используйте свежие взвеси тестовых штаммов, приготовленных накануне из культур, выращенных в правильной жидкой среде (например, соевый бульон **Tryptic** или **Trypticase** для аэробов и бульон Шедлера с витамином К для анаэробов). В качестве альтернативы можно использовать свежие взвеси, приготовленные накануне из культур, выращенных на плотной среде. Срок инкубации культур должен быть увеличен, если для тестового штамма характерен медленный рост.

Для **тестирования питательной способности среды в чашке**, в соответствии со стандартом CLSI M22, нужно развести взвесь инокулята так, чтобы получить $1-2 \times 10^4$ колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашку⁴. Если при этом не образуется отдельных колоний, нужно использовать в десять раз менее концентрированный инокулят. В соответствии со стандартом DIN EN 12322 ростоускоряющие свойства среды можно протестировать, если удалось добиться показателя в 100–1000 КОЕ или количества КОЕ, достаточного для образования отдельных колоний при использовании правильной штриховой техники посева⁵. Если штаммы засеваются с использованием количественной техники, достаточно 50–500 КОЕ, чтобы получить отдельные колонии, которые можно пересчитать. В соответствии с патентами, зарегистрированными в США и ЕС, нужно использовать 10–100 КОЕ на одну чашку (контейнер)^{6,7}.

Для **тестирования подавляющей способности селективной среды на чашке**, в соответствии со стандартом CLSI M22, для инокуляции на чашку нужно использовать $1-2 \times 10^5$ КОЕ (в соответствии со стандартом DIN EN 12322^{4,5} — число КОЕ, большее в 10^4 раз). Чрезмерный посев нежелательных штаммов может «перегружать» среду, приводя к «неконтролируемому» росту.

Для сравнения всегда включайте в исследование отдельную эталонную неизбирательную среду, которая обеспечивает рост для всех тестовых штаммов. Для аэробных штаммов это колумбийский агар с 5%-ной овечьей кровью, для прихотливых штаммов (например, для *Neisseria gonorrhoeae*) это шоколадный агар, для анаэробных штаммов — агар Шедлера с витамином К и 5 %-ной овечьей кровью, для грибов — глюкозный агар Сабуро. При количественном тестировании рост «желаемых» штаммов на тестовой среде должен составлять не менее 70 % роста на эталонной среде. На избирательной среде рост «нежелательных» штаммов должен быть полностью или частично подавлен. Степень подавления роста зависит от среды и штамма, но обычно интенсивность роста сокращается на 10^3-10^4 (или более), если сравнивать с неселективной эталонной средой.

Для тестирования **эффективности роста на среде во флаконах** используются сравнительные методы. Небольшие флаконы и пробирки нужно засеивать, используя 10^5 КОЕ, в соответствии со стандартом CLSI M22-A2⁴. В соответствии с патентами, зарегистрированными в США и ЕС, а также стандартом DIN EN 12322 требуется тот же инокулят, что и для сред в чашках (см. выше)⁵⁻⁷. Для флаконов или пробирок с объемом более 10 мл сначала нужно развести аликвотные растворы объемом 5 и 10 мл, а затем протестировать их тем же способом.

Выполните инкубацию и проверку засеянных сред в соответствии с инструкциями к каждому продукту.

Определите уровень **pH** потенциометрическим способом при комнатной температуре (25°C), чтобы убедиться в соответствии характеристикам, указанным для продукта. Диапазон pH, указанный в **Инструкциях по применению**, определяется после изготовления среды. Он может несколько отличаться в зависимости от срока хранения и используемой электродной системы.

Стерильность продукта можно протестировать путем инкубации нескольких чашек (или контейнеров, т. е. флаконов) при соответствующей температуре (например, 28–35°C) в течение 5–7 дней (либо в соответствии с описанными для продукта процедурами)^{6, 7}.

Чтобы определить стерильность изначально мутных жидких сред, нужно пересеять их после инкубации на подходящую плотную среду (например, в чашку с соевым агаром **Trypticase**). В сомнительных случаях целесообразно выполнить окрашивание по Граму и микроскопию.

МЕТОДИКА

В разделе **Предоставленные материалы** указан тип среды и контейнера.

Большинство готовых к использованию плотных питательных **BD** предоставляются в 90-миллиметровых чашках **BD Stacker**. Эти контейнеры специально разработаны для минимизации риска выскальзывания из стопки. Некоторые готовые к использованию плотные среды **BD** предоставляются в других чашках, например в разделенных, контактных, 150-миллиметровых или квадратных чашках. В зависимости от сферы применения и методики исследования готовые к использованию или частично заполненные жидкие питательные среды **BD** могут предоставляться во флаконах или пробирках различной формы и объема, а также иметь различные закрывающие механизмы.

В этом разделе предоставлены сведения о микробиологическом состоянии продукта.

Среды в чашках и погружных пластинах, а также некоторые среды во флаконах и пробирках заполнены с соблюдением правил асептики. Это контейнеры, прошедшие микробиологический контроль. Для этих сред стандарт DIN EN 12322 подразумевает частоту загрязнения не более 5 %⁵. Критерии, предъявляемые к герметичности контейнера, более строгие.

Среды во флаконах, окончательно стерилизованные в контейнерах, помечаются символом стерильности, а также символом термометра (флаконы, стерилизованные в автоклаве). К этим средам применимы критерии стерильности в соответствии со стандартами ЕС⁶.

В разделе **Непредоставляемые материалы** описано специальное оборудование, используемое при тестировании. Не указаны широко применяемые в лабораториях инструменты, например бактериологические петли, шпатели, пипетки, инкубаторы и др.

В разделе **Типы образцов** описаны образцы, используемые с конкретными средами. При необходимости указываются специальные требования к сбору и транспортировке (раздел **Сбор и транспортировка**).

Образцы нужно забирать и транспортировать должным образом, используя подходящие контейнеры для транспортировки, во избежание высушивания, излишнего воздействия кислорода и чрезмерного роста комменсальных микроорганизмов. Срок от момента взятия образца до его обработки в лаборатории должен быть минимальным. Подробные сведения о методах сбора и транспортировки конкретных патогенных микробов см. в соответствующих справочных материалах⁸.

В главе **Методика тестирования** приводится общая и частная информация о посеве на питательную среду, а также, при необходимости, сведения об использовании дополнительных сред.

Посев на питательную среду

Устоявшейся лабораторной методикой является т. н. штриховая техника посева на питательную среду. В каждой чашке на среду наносится три штриха микробиологической петлей (петля заново стерилизуется перед каждым штрихом). Если используются предварительно стерилизованные петли, каждый штрих нужно наносить отдельной петлей. Если материал засевают с тампона, следует повернуть тампон над небольшим участком поверхности возле края, а затем сделать штрихи с этого участка при помощи петли (для «изоляции» штрихов от зоны посева у края).

Эта техника позволяет изолировать отдельные колонии от смешанных культур. Чистые культуры, полученные из отдельных колоний, необходимы для идентификации и проверки чувствительности изолятов.

Также в этом разделе указаны температура и время инкубации.

Важно регулярно проверять истинную температуру инкубаторов.

Температура ниже или выше установленного диапазона может привести к потере жизнеспособности микроорганизмов, снижению интенсивности роста и невозможности результатов.

При инкубации готовых к использованию сред в чашках необходимо соблюдать адекватную **влажность**, особенно если среды инкубируются в течение продолжительного периода времени. В этом случае нельзя использовать инкубаторы с циркуляцией воздуха — это может привести к значительному высушиванию среды (особенно, если воздух в лаборатории имеет низкую влажность). Культуры микроорганизмов, приспособленные к влажной среде, например культуры *Legionella*, должны инкубироваться в увлажняемых камерах или емкостях. Если нужно снизить интенсивность испарения, чашки следует загерметизировать, используя клейкую ленту. Тем не менее, нужно оставить небольшой зазор для минимального газообмена.

Это правило также применимо к жидким средам во флаконах: закручивающиеся крышки во время инкубации должны быть закручены не до конца.

В разделе **Результаты** представлены сведения о внешнем виде микроорганизмов, культивированных в конкретной питательной среде. Эти сведения не касаются питательных сред общего назначения — невозможно предоставить точные данные для всех микроорганизмов, способных к росту на питательной среде. Также следует ознакомиться со справочными материалами⁹.

Точные данные предоставлены в разделе **Расчет и интерпретация результатов**. Этот раздел приводится в случае, если диагноз напрямую зависит от количества патогенных микробов в образце. В качестве примера можно привести агар CLED (цистин-лактозо-электролит-дефицитный агар), используемый для подсчета бактерий в моче.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ

Эффективность среды обсуждается. Если это применимо, приводятся типы микроорганизмов, которые можно изолировать на среде, и источники, подтверждающие этот факт. В этом разделе могут быть указаны результаты оценки эффективности новых или недавно представленных сред.

Особенно важно не забывать, что посев образца в одну среду крайне редко позволяет обнаружить все потенциально значимые микроорганизмы. Кроме того, в отдельно взятой популяции микроорганизмов могут существовать штаммы, не растущие должным образом на конкретной среде, даже в том случае, если среда показала свою эффективность в обнаружении большинства остальных штаммов данного вида. Таким образом, большую часть образцов стоит исследовать, используя одновременно одну или две избирательные среды, либо две избирательные среды с разной степенью избирательности.

Также в этом разделе приведены известные **ограничения методики**.

В большинстве случаев для окончательной идентификации изолированных на среде микроорганизмов необходимы дополнительные тестирования.

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

В этом разделе приведены ссылки на литературу, встречающиеся в документе.

УПАКОВКА И НАЛИЧИЕ

В этом разделе приведены **номера по каталогу, габариты упаковки** и различные упоминаемые в документе форматы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В этом разделе приведена дополнительная информация, например адрес изготовителя (символ «завода»). В конце документа перечислены использованные товарные знаки.

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ЦИТИРОВАННЫЕ В ДОКУМЕНТЕ «ОБЩИЕ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ»

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001–0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001–0098.
3. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work

(seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 98/391/EEC).
Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021–0045.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. Search for latest version at www.pheur.org
7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. Search for latest version at www.uspnf.com
8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009
BD

© 2009 Becton, Dickinson and Company