

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФБУН «Государственный научный  
центр прикладной микробиологии и  
биотехнологии»

\_\_\_\_\_ И.А. Дятлов

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

## **ИНСТРУКЦИЯ**

### **по применению набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая» (ГБМ-агар)**

#### **1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА**

Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая» (ГБМ-агар) предназначен для бактериологических исследований в клинической микробиологии при анализе клинического материала от больных с подозрением на бактериальный менингит и с другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, а также при работе с чистыми культурами *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

ГБМ-агар предназначен для использования врачами-бактериологами, эпидемиологами и другими специалистами в области бактериологии.

#### **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

ГБМ-агар состоит из сухой основы питательной среды (далее – Основа) – 1 банка и ростовой добавки (далее – РД) – 5 флаконов.

Основа представляет собой мелкодисперсный порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. Основу получают смешиванием сухих компонентов.

РД представляет собой пористую массу розового цвета, которую получают путём лиофильного высушивания раствора компонентов. Допускается неоднородная окраска РД.

### 3.ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает выделение и рост основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов и других требовательных микроорганизмов. В состав Основы ГБМ-агара входит стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ). СРГМ представляет собой мелко-дисперсный порошок, полученный путём ферментативного гидролиза суспензии чёрного альбумина с последующей сушкой методом распыления. Чёрный альбумин представляет собой либо высушенную дефибринированную кровь, либо высушенную массу форменных элементов крови, включая эритроциты, отделенную от сыворотки (плазмы) крови отстаиванием или сепарированием. В процессе сушки чёрного альбумина под воздействием повышенной температуры происходит разрушение эритроцитов. В связи с этим СРГМ имеет в своём составе термически лизированные эритроциты, а так же служит в питательной среде источником фактора X, необходимым для роста гемофильной палочки.

Другой фактор роста бактерий рода *Haemophilus* (V-фактор – никотинамидадениндинуклеотид), содержится в РД. Кроме того, РД включает ряд веществ, стимулирующих рост пневмококков и менингококков.

Исследуемый при диагностике бактериальных менингитов клинический материал (ликвор, кровь) в норме стерилен, поэтому любой выделенный из него микроорганизм может быть этиологическим агентом заболевания. Если использовать питательные среды, содержащие антибактериальные препараты в процессе исследования крови или спинно-мозговой жидкости, то возникает вероятность получения ложно-отрицательных результатов. ГБМ-агар не содержит ингибиторов роста микроорганизмов.

### 4.СОСТАВ

Состав Основы на 1 л питательной среды:

Панкреатический гидролизат казеина .....	15,0 г
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов .....	12,0 г
Дрожжевой экстракт .....	5,0 г
Пептон мясной .....	5,0 г
Глюкоза .....	1,0
Натрий хлористый .....	1,0 г
Крахмал растворимый .....	1,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещённый, безводный .....	0,5 г
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) <sup>1</sup> г

<sup>1</sup> Варьирование величины связано с различной прочностью агарового геля

Состав РД, мг/л среды:

Цистеина гидрохлорид .....	250,0
L-глутамин .....	100,0
Аденин .....	10,0
Никотинамидадениндинуклеотид .....	1,5
Цианокобаламин .....	1,0
Тиамина пиродифосфат .....	1,0

## 5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

5.1. Специфическая активность (чувствительность среды, скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов).

Питательная среда, приготовленная по п. 9.1 настоящей инструкции, через 18-24 ч инкубации при температуре (37±1) °С в атмосфере 5-10 % CO<sub>2</sub> обеспечивает рост следующих контрольных тест-штаммов:

*H. influenzae* ATCC 49247 - в виде серых слизистых, блестящих колоний диаметром 1,0-2,0 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10<sup>-6</sup>;

*N. meningitidis* ATCC 13102 - в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний диаметром 1,0-2,0 мм с идеально ровными краями при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10<sup>-6</sup> через;

*S. pneumoniae* ATCC 6305 - в виде мелких полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний диаметром 0,4-0,6 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10<sup>-5</sup>. В зоне роста культуры должно наблюдаться обесцвечивание питательной среды.

### 5.2. Результаты клинических испытаний.

При исследовании 72 образцов носоглоточной слизи для бактериологического выявления назофарингеального носительства в ходе проведения клинических испытаний ГБМ-агара при доверительной вероятности 90%, выделены возбудители (*H. influenzae* тип b, *N. meningitidis* тип А, *S. pneumoniae*) в 19 образцах, выявляемость положительных проб составила 95%±2% как на ГБМ-агаре, так и на контрольной среде – Шоколадный агар.

При проведении лабораторных исследований по выделению возбудителей гнойных бактериальных менингитов на ГБМ-агаре с использованием модели клинического материала (сыворотки крови) в 23 образцах, искусственно контаминированных чистыми культурами тест-штаммов, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», было получено 23 положительных результата, ложно отрицательных ответов не было.

## **6.МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2 Б (Приказ МЗРФ №4н от 06.06.2012 г).

При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Не использовать компоненты ГБМ-агара по истечении срока годности. Не использовать при нарушении целостности флаконов с РД во время транспортировки или хранения!

Неиспользованные компоненты набора с истёкшим сроком годности утилизируются любым методом, предотвращающим повторное использование по назначению.

Исследования с помощью ГБМ-агара проводить только в условиях специализированных бактериологических лабораторий медицинскими специалистами, имеющими разрешение на работу с микроорганизмами III-IV группы патогенности.

## **7.ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- весы лабораторные 2 класса точности
- автоклав;
- чашки Петри;
- пипетки стеклянные или механические, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5 мл;
- вода дистиллированная, стерильная;
- колбы стеклянные, объёмом не менее 1 л
- термостат, обеспечивающий температуру (37±1) °С;
- оборудование и материалы для поддержания атмосферы с содержанием 5-10% CO<sub>2</sub> (анаэростат с газогенерирующим пакетом, «свечной» сосуд с парафиновой свечой или CO<sub>2</sub>-инкубатор)

## **8.АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Основным биологическим материалом для исследования при бактериальных менингитах служит спинномозговая жидкость и кровь. Для бактериологического выявления назофарингеального носительства исследуют носоглоточную слизь. При выявлении назофарингеального носительства рекомендуем использовать селективные добавки (СД-Г, СД-П и СД-М; см. п. 9.4) в соответствии с Методическими

рекомендациями МР 4.2.0078/1-13 от 21 октября 2013 г «Использование питательных сред для диагностики бактериальных менингитов».

Питательную среду можно использовать также при работе с чистыми культурами *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* и другими требовательными микроорганизмами.

## **9.ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

Исследования образцов проводят в соответствии с рекомендациями, изложенными в МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов».

### **9.1. Подготовка к анализу**

Приготовление питательной среды. Препарат Основы в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, нагревают до кипения, стерилизуют в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

В асептических условиях вскрывают флакон с РД и растворяют содержимое в 5,0 мл стерильной дистиллированной воды.

В охлаждённую до температуры  $(45-55) ^\circ\text{C}$  Основу в асептических условиях вводят раствор РД из расчёта 5,0 мл на 1л Основы (1 флакон РД на 1 л Основы), разливают в стерильные чашки Петри, закрывают крышками и ставят для застывания при температуре  $18-25 ^\circ\text{C}$ .

**Раствор РД не хранить, использовать немедленно после приготовления!**

Готовая к применению питательная среда, разлитая в чашки Петри, прозрачная от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. Допускается наличие осадка от тёмно-коричневого до чёрного цвета. Готовую среду можно использовать в течение 7-10 дней при условии хранения её при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$ .

### **9.2. Посев и инкубация.**

Посев анализируемых образцов производят сразу же после их получения на предварительно прогретые в течение 10-15 мин в термостате при температуре  $(37\pm 1) ^\circ\text{C}$  чашки со средами. Чашки с посевами инкубируют в перевёрнутом положении (крышкой вниз) в атмосфере 5-10 %  $\text{CO}_2$  при температуре  $(37\pm 1) ^\circ\text{C}$ , время инкубации зависит от типа образца и целей исследования.

### **9.3. Учёт результатов.**

Учёт результатов проводят визуально по наличию характерных колоний через 24-48 ч инкубации.

*H. influenzae* формирует серые слизистые блестящие колонии диаметром до 2 мм. Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического "мышинного" запаха.

*N. meningitidis* формирует полупрозрачные блестящие сероватого цвета колонии с идеально ровными краями диаметром до 2 мм,

*S. pneumoniae* формирует мелкие полупрозрачные чётко очерченные, не склонные к слиянию колонии, обесцвечивающие питательную среду в зоне роста.

9.4. При исследовании носоглоточной слизи рекомендуется использование селективного варианта ГБМ-агара. Для этого во время приготовления питательной среды одновременно с РД вносят селективную добавку. Селективные добавки в состав набора не входят. В соответствии МР 4.2.0078/1-13 от 21 октября 2013 г возможно самостоятельное приготовление и использование селективных добавок СД-Г, СД-П или СД-М, входящих в состав Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению» (Шоколадный агар, РУ № ФСР 2012/13081)

СД-Г предназначена для выделения *H. influenzae*. Благодаря природной устойчивости *H. influenzae* к бацитрацину, селективная добавка позволяет избирательно выделять гемофильную палочку из контаминированного материала, ингибируя рост широкого спектра микроорганизмов.

Состав СД-Г, мг/л среды:

Амфотерицин В .....	5,0
Бацитрацин .....	500,0
Ванкомицин .....	3,0

СД-П предназначена для выделения *S. pneumoniae*. Селективная добавка ингибирует рост грамотрицательных и не подавляет рост грамположительных микроорганизмов.

Состав СД-П, мг/л среды:

Амфотерицин В .....	5,0
Полимиксин В .....	10,0
Налидиксовая кислота .....	17,0

СД-М предназначена для выделения *N. meningitidis*. Селективная добавка подавляет рост широкого спектра как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, позволяя выделять менингококков из контаминированного материала.

Состав СД-М, мг/л среды:

Амфотерицин В .....	5,0
Полимиксин В .....	10,0
Ванкомицин .....	3,0

Все три селективные добавки подавляют рост *Candida albicans*.

## 10. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ.

Утилизация серий ГБМ-агара с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке производится по СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы.

Уничтожение ГБМ-агара после работы с музейными штаммами и образцами клинического и другого инфицированного материала осуществляется по СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре (126±2) °С.

Обращение с медицинскими отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации, осуществляющей медицинскую и (или) фармацевтическую деятельность. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

## 11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Набор реагентов транспортируют всеми видами крытого транспорта при соблюдении условий хранения.

Хранят в герметично закрытой упаковке в сухом защищённом от света месте. Основу хранят при температуре от 2 °С до 25 °С, а РД при температуре от 2 до 8 °С. После вскрытия банку с Основой хранят до окончания срока годности плотно закрытой, в сухом месте, избегая попадания влаги.

РД после вскрытия не хранят, используют немедленно после приготовления!

Срок годности – 2 года.

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

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных

менингитов, сухая» (ГБМ-агар) в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. 8 (4967) 36-00-17.