

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН

«Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии»

_____ И.А. Дятлов

« ____ » _____ 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**«Питательная среда для выделения и культивирования легионелл сухая
(Легионелбакагар)»**

для санитарно-бактериологических исследований

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Питательная среда для выделения и культивирования легионелл сухая (Легионелбакагар)» предназначен для выделения легионелл из объектов окружающей среды при проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий и для культивирования легионелл, далее по тексту - Легионелбакагар.

Не является медицинским изделием.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Легионелбакагар выпускается комплектом: основа - 1 банка, ростовая добавка (РД) – 8 флаконов, селективная добавка (СД) – 8 флаконов. Комплект рассчитан на приготовление 8 литров питательной среды для выделения и культивирования легионелл.

Основа легионелбакагара представляет собой мелкодисперсный порошок серо-черного цвета, который получают смешиванием сухих компонентов. Порошок гигроскопичен, светочувствителен.

РД – мелкодисперсный порошок белого цвета.

СД – мелкодисперсный порошок желтого цвета

Основа легионелбакагара выпускается в полиэтиленовых банках объемом 600 мл по 250 г, добавки во флаконах - ростовая по 0,4 г и селективная по 0,0215 г.

2.1. Принцип действия

Сбалансированный состав Легионелбакагара с учетом питательных потребностей *Legionella spp*, содержащий белковую основу, стимулятор роста гемофильных микроорганиз-

мов, комплекс витаминов, пирофосфат железа и уголь активированный обеспечивает рост легионелл различных серогрупп при низких посевных концентрациях в виде гладких, выпуклых колоний белого цвета с ровными краями. Использование селективной добавки позволяет произвести выделение легионелл из контаминированных исследуемых образцов, предположительно содержащих легионеллы.

2.2. Состав

Состав основы, г/л:

– Сернокислотный гидролизат рыбной муки сухой (ГРМ _{фк})	5,0
– Дрожжевой экстракт	5,0
– Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов.....	5,0
– Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный	4,0
– Железа пирофосфат растворимый	0,25
– Агар бактериологический	12,0±2,0

Состав ростовой добавки (РД), г/л:

– L-цистеина гидрохлорида моногидрат	0,4
--	-----

Состав селективной добавки (СД), г/л:

– Полимиксина В сульфат (80000 ЕД)	0,01±0,002
– Ванкомицина гидрохлорид	0,0015
– Амфотерицин В	0,01

рН от 6,9 до 7,3

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 сухого Легионелбакагара 100 мл дистиллированной воды. 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. После внесения добавок рН готовой среды от 6,8 до 7,2.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность. Легионелбакагар с СД и РД обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} не позднее 96 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов *Legionella pneumophila Philadelphia 1* ATCC 33152 и *Legionella micdadei* NCTC 11371 в количестве не менее 50 гладких,

выпуклых колоний белого цвета с ровными краями диаметром не менее 1,0 мм. Наличие атипичных колоний не допускается.

Ингибирующие свойства. Легионелбакагар с СД и РД полностью подавляет рост тест-штаммов *Escherichia coli* АТСС 25922 и *Bacillus cereus* АТСС 10702 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} через 96 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При анализе исследуемого материала необходимо соблюдение СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

В состав среды входят антибиотики, которые могут вызывать раздражение органов дыхания. Во время работы необходимо использовать индивидуальные средства защиты органов дыхания и рук.

На этикетке коробки с СД должен быть предупредительный знак «!».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру 37 ± 1 °С
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1мл, 2 мл, 5 мл.
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Чашки Петри стерильные
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Объекты исследований: смывы с объектов при проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий.

6.2 Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с МУК 4.2.2217-07 «*Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды», СП 3.1.2.2626-10 «Профилактика легионеллеза», СанПиН 2.1.4.2496-09, "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и другими нормативными документами.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление Легионелбакагара.

7.1.1. Приготовление основы.

Навеску основы в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, тщательно размешивают в 990 мл дистиллированной воды, кипятят в течение 2 мин до полного расплавления агара и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

7.1.2. Приготовление ростовой добавки.

Содержимое флакона с РД растворяют в 5 мл дистиллированной воды и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

7.1.3. Приготовление селективной добавки.

Содержимое флакона с СД растворяют в 5 мл стерильной дистиллированной воды.

7.1.4. Приготовление основы с РД и СД.

Для приготовления 1 л Легионелбакагара в охлажденную до температуры 45-50 °С стерильную основу (п. 7.1.1) асептически вносят стерильный раствор ростовой добавки в объеме 5 мл (п. 7.1.2) и раствор селективной добавки в объеме 5 мл (п. 7.1.3), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовая питательная среда непрозрачная черного цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 7 суток при условии хранения её при температуре от 2 до 8 °С.

7.2. Посев анализируемых проб производят в соответствии с нормативными документами (п. 6.2). По 0,1 мл подготовленного к посеву образца высевают на чашки со средой Легионелбакагар с ростовой и селективной добавками, распределяя по поверхности питательной среды шпателем или стеклянной палочкой. Чашки инкубируют при 37 °С до 10 дней во влажной атмосфере.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально, учитывая наличие роста на чашках со средой. Просмотр посевов проводят ежедневно, начиная со 2 дня. Легионеллы представляют собой гладкие, выпуклые колонии белого цвета с ровными краями. При обнаружении подобных колоний их отсеивают на чашки с соответствующей средой. Для идентификации бактерий рода *Legionella spp.* используют окраску мазков по Граму и посев на среду Легионелбакагар без селективной и ростовой добавок, на которой колонии легионелл не вырастают. Для дальнейшей идентификации выделенной культуры используют альтернативные методы (латексную агглютинацию, ПЦР диагностику, МФА и т.д.)

9. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Утилизация серий среды с истекшим сроком годности и в случае нарушения целостности упаковки, производится по СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы.

Уничтожение Легионелбакагара после проведения биологического контроля и исследованных образцов 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 ± 1) °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.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Основу Легионелбакагара хранят в герметично закрытой банке в сухом защищенном от света месте, в помещении при температуре от 2 до 30 °С. После вскрытия банку с основой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30 °С, избегая попадания влаги. РД и СД хранят при температуре 2-8 °С.

Легионелбакагар транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Срок годности комплекта - 2 года. Комплект с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Изготовитель гарантирует соответствие Легионелбакагара заявленным в ТУ 20.59.52-300-78095326-2018 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения и транспортирования.

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

По всем вопросам, касающимся качества изделия «Питательная среда для выделения и культивирования легионелл сухая (Легионелбакагар)», обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.