

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГУН
Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии

« ____ » _____ 2010 г.
И.А.Дятлов

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований

**«ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ
ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ, ГОТОВАЯ К ПРИМЕНЕНИЮ»
(ГЕМОФИЛУС АГАР)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар)» предназначена для бактериологических исследований в клинической микробиологии с целью культивирования и выделения бактерий рода *Haemophilus*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Гемофилус агар представляет набор, состоящий из основы среды (далее - Основа) - 1 флакон, ростовой добавки (РД) - 1 флакон и селективной добавки (СД) - 1 флакон.

Основа представляет собой непрозрачный гель темно-коричневого или черного цвета, стерильный, разлитый по 100 мл во флаконы вместимостью 100 мл, РД - пористая масса белого цвета, стерильная, расфасована во флаконы вместимостью 10 мл, СД - порошок белого цвета, расфасован во флаконы вместимостью 10 мл.

3. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Основа, содержащая стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, обогащена фактором X (гемин). Другой фактор, необходимый для роста бактерий рода *Haemophilus*

(V-фактор - никотинамидадениндинуклеотид - НАД), содержится в РД. Совокупность компонентов, входящих в состав набора (Основа, РД и СД) обеспечивает рост бактерий рода *Haemophilus*, образование капсулы у капсульных форм *Haemophilus influenzae* и ингибирование микробов-ассоциантов.

4. СОСТАВ, г/л:

Состав Основы, г/л:

Панкреатический гидролизат казеина.....	15,0
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов.....	12,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Пептон	5,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,8
Натрий хлористый	1,0
Крахмал растворимый	1,0
Агар микробиологический	12,0±2,0
Вода дистиллированная	1000 мл

Флакон с РД содержит 0,1 мг НАД.

Флакон с СД содержит 30 мг бацитрацина.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Гемофилус агар обеспечивает рост тест-штаммов *Haemophilus influenzae* 423(*mun b*) и *Haemophilus influenzae* ATCC 9006 при посеве по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} через 18-24 ч инкубации посевов при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере 5-10 % CO_2 в виде слизистых, круглых, сероватого цвета, полупрозрачных колоний диаметром до 2 мм.

Питательная среда полностью подавляет рост тест-штаммов микробов-ассоциантов: *Streptococcus pyogenes* Dick-1, *Neisseria meningitidis* A 208 при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. *N.meningitidis* A-208 культивируют в атмосфере 5-10 % CO_2 .

Взвеси используемых тест-штаммов микроорганизмов готовятся по стандартному образцу мутности на 10 ед (ОСО 42-28-85 П) путем ряда десятикратных разведений.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) сани-

тарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения» (Москва, 1981г.) и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Не использовать компоненты Гемофилус агара по истечении срока годности
- Не использовать флаконы набора Гемофилус агара со следами контаминации.
- После смешивания компонентов Гемофилус агар следует полностью использовать (не плавить повторно!).

7. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат, обеспечивающий температуру (37±1) °С;
- генераторы атмосферы, обогащенной 5-10% CO₂, или парафиновая свеча;
- контейнер для инкубации (анаэроустат или «свечной» сосуд);
- водяная баня или автоклав, работающий в режиме "стерилизации текучим паром";
- чашки Петри;
- пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 2 мл;
- вода дистиллированная, стерильная.

8. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Клинический материал от больных гнойным бактериальным менингитом и другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями рода *Haemophilus*. Среду можно использовать также при работе с чистыми культурами *Haemophilus*.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования образцов проводятся в соответствии с рекомендациями, изложенными в Методических рекомендациях для микробиологов "Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*", КМАХ. - 2000. - Т. 2. - С. 93-109 и МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов».

9.1. Подготовка к анализу

Подготовка раствора ростовой добавки.

1. Выдержите флакон с РД до достижения комнатной температуры.
 2. В асептических условиях растворите содержимое флакона с РД в 2 мл стерильной дистиллированной воды.
 3. Перемешайте до полного растворения.
- Приготовление чашек со средой.

1. Не вскрывая, поместите флакон с Основой на водяную баню с температурой 50 °С и поднимите температуру до 95 °С, выдерживайте приблизительно 30-40 минут до полного растворения агара. Возможно расплавление Основы в автоклаве в режиме «стерилизации текучим паром».

2. Перемешайте.

3. Охладите Основу до 45-50 °С.

4. Вскройте флакон с Основой и внесите в охлажденную Основу ростовую добавку из расчета содержимое 1 флакона с РД (2 мл) на 100 мл Основы (содержимое 1 флакона с Основой).

5. При необходимости вместе с РД внесите СД из расчета 1 флакон на 1 флакон Основы, предварительно растворив ее в 2 мл стерильной дистиллированной воды. (После растворения РД и СД не хранить, использовать немедленно.)

6. Перемешайте и разлейте в чашки Петри (18-20 мл на чашку).

7. Чашки с готовой средой можно хранить при температуре 4-8 °С не более 7 дней без заметного изменения ростовых свойств.

9.2. Посев и инкубация

1. Перед посевом выдержите чашки со средой до достижения комнатной температуры.

2. Произведите посев на чашки сразу после получения образцов.

3. Инкубируйте чашки в атмосфере, обогащенной 5-10% CO₂.

4. Инкубируйте чашки в перевернутом положении (крышкой вниз) при температуре 37 °С, Время инкубации зависит от типа образца и целей исследования. Как правило, учет результатов проводится через 24-48 ч.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят визуально в соответствии с «Методами контроля бактериологических питательных сред: Методические указания (МУК 4.2.2316-08)». Через 24 ч инкубации штаммы *H. influenzae* формируют слизистые, сочные, полупрозрачные, гладкие колонии сероватого цвета диаметром до 2 мм.

Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического "мышинного" запаха.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Флаконы с Основой необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С. Флаконы с РД и СД хранить герметично закрытыми при температуре 2-8 °С.

Срок годности - 1 год.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов «Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар)» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.