

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии

И.А.Дятлов
« ____ » _____ 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований

**«ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНЫХ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ, ГОТОВАЯ К ПРИМЕНЕНИЮ»
(ШОКОЛАДНЫЙ АГАР)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар)» предназначена для бактериологических исследований в клинической микробиологии с целью культивирования и выделения бактерий *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* из клинического материала.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Шоколадный агар представляет собой набор, состоящий из основы питательной среды (далее - Основа) - 4 бутылки, ростовой добавки (далее - РД-ША) - 4 флакона, селективной добавки для выделения гемофильной палочки (далее - СД-Г) – 1 флакон, селективной добавки для выделения пневмококков (далее – СД-П) - 1 флакон, селективной добавки для выделения менингококков (далее - СД-М) - 1 флакон.

Основа представляет собой непрозрачный гель светло-коричневого цвета, стерильный, разлитый по 100 мл бутылки вместимостью 100 мл, РД-ША - порошок светло-розового цвета, стерильный, расфасованный во флаконы из тёмного стекла вместимостью

7-10 мл, СД-Г, СД-П, СД-М - порошки от белого до светло-желтого цвета, расфасованы во флаконы из тёмного стекла вместимостью 7-10 мл.

3. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Основа, содержащая гемоглобин, обогащена фактором X, необходимым для роста гемофильной палочки. Другой фактор, необходимый для роста бактерий рода *Haemophilus* (V-фактор – никотинамидадениндинуклеотид — НАД), содержится в РД-ША. Кроме того, РД-ША включает ряд веществ, стимулирующих рост пневмококков и менингококков. Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает рост основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов и ингибирование микробов-ассоциантов при применении соответствующих селективных добавок.

4. СОСТАВ, г/л среды:

Состав основы г/л:

Панкреатический гидролизат казеина (ПГК).....	15,0
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	5,0
Дрожжевой экстракт.....	5,0
Пептон сухой ферментативный	5,0
Калия фосфорнокислый двузамещённый, трехводный	2,0
Натрий хлористый	1,0
Крахмал растворимый	1,0
Агар микробиологический	(12,0±2,0)
Гемоглобин.....	10,0
Вода дистиллированная	1000 мл
Состав РД-ША, мг/100 мл:	
Цистеина гидрохлорид.....	25,0
L-глутамин.....	10,0
Аденин	1,0
Никотинамидадениндинуклеотид	0,15
Цианокобаломин	0,1
Тиамин пиррофосфат.....	0,1
Состав СД-Г, мг/100 мл:	
Амфотерицин	0,5
Бацитрацин	30,0
Ванкомицин	0,3

Состав СД-П, мг/100 мл:

Амфотерицин.....	0,5
Полимиксин В	1,0
Налидиксовая кислота	1,5
Натрия карбонат.....	10,0
Мальтодекстрин Глюсидекс 19.....	25,0

Состав СД-М, мг/100 мл:

Амфотерицин.....	0,5
Ванкомицин	0,3
Полимиксин В	1,0
Мальтодекстрин Глюсидекс 19	50,0

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Шоколадный агар обеспечивает рост тест-штаммов *H. influenzae mun b 423*, *N. meningitidis A 208* при посеве по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} и *S. pneumoniae ATCC 6305* при посеве 0,1 мл взвеси тест-штамма из разведения 10^{-5} через 18-24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере 5-10 % CO_2 .

Тест-штамм *H. influenzae mun b 423* растёт в виде слизистых, круглых, полупрозрачных, сероватого цвета колоний диаметром 1,0 - 2,0 мм.

Тест-штамм *S. pneumoniae ATCC 6305* растёт в виде прозрачных, не склонных к слиянию колоний, которые могут быть как выпуклыми, так и плоскими с центральным углублением, диаметром до 0,5 мм. В зоне роста культуры наблюдается изменение цвета питательной среды с коричневого до зелёного различной степени интенсивности.

Тест-штамм *N. meningitidis A 208* растёт в виде полупрозрачных, выпуклых с ровными краями колоний диаметром 1,0 – 1,5 мм.

Питательная среда, содержащая СД-Г, полностью подавляет рост тест-штаммов *S. pneumoniae ATCC 6305*, *N. meningitidis A 208*, *Candida albicans ATCC 60193* и *S. aureus Wood-46*, из разведения 10^{-4} и обеспечивает рост *H. influenzae mun b 423* из разведения 10^{-6} .

Питательная среда, содержащая СД-П, полностью подавляет рост тест-штаммов *H. influenzae mun b 423*, *N. meningitidis A 208*, *C. albicans ATCC 60193* из разведения 10^{-4} и обеспечивает рост *S. pneumoniae ATCC 6305* из разведения 10^{-5} .

Питательная среда, содержащая СД-М, полностью подавляет рост тест-штаммов *H. influenzae mun b 423*, *S. pneumoniae ATCC 6305*, *S. aureus Wood-46*, *C. albicans ATCC 60193* из разведения 10^{-4} и обеспечивает рост *N. meningitidis A 208* из разведения

10⁻⁶. 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) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения» (Москва, 1981 г.) и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Не использовать компоненты Шоколадного агара по истечении срока годности
- Не использовать флаконы и бутылки набора Шоколадного агара со следами контаминации.
- После смешивания компонентов Шоколадного агара 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 до 2 мл;
- вода дистиллированная, стерильная.

8. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Клинический материал от больных гнойным бактериальным менингитом и другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями рода *Haemophilus*, *Streptococcus* или *Neisseria*. Среду можно использовать также при работе с чистыми культурами *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

9.1. Подготовка к анализу

Подготовка раствора ростовой добавки.

1. Выдержать флакон с РД-ША до достижения комнатной температуры.
2. В асептических условиях растворить содержимое флакона с РД-ША в 2 мл стерильной дистиллированной воды.

3. Перемешать до полного растворения.

Приготовление чашек со средой.

1. Не вскрывая, поместить бутылку с Основой на водяную баню с температурой (50 ± 5) °С и поднять температуру до (95 ± 5) °С, выдержать приблизительно 30-40 минут до полного растворения агара. Возможно расплавление Основы в автоклаве в режиме «стерилизации текучим паром».

2. Перемешать.

3. Охладить Основу до 45-50 °С.

4. Вскрыть бутылку с Основой и внести в охлажденную Основу ростовую добавку из расчета содержимое 1 флакона с РД-ША (2 мл) на 100 мл Основы (содержимое 1 бутылки с Основой).

5. Для приготовления селективных вариантов питательной среды вместе с РД-ША внести одну из селективных добавок СД-Г или СД-П, или СД-М, в зависимости от микроорганизмов, с которыми предстоит работать, из расчета 1 флакон селективной добавки на 1 бутылку Основы, предварительно растворив ее в 2 мл стерильной дистиллированной воды. (После растворения РД-ША и селективные добавки не хранить, использовать немедленно.)

6. Перемешать и разлить в чашки Петри слоем 4-5 мм.

7. Чашки с готовой средой можно хранить при температуре (4 ± 2) °С не более 7 дней без заметного изменения ростовых свойств.

9.2. Посев и инкубация

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

2. Произвести посев на чашки сразу после получения образцов.

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

4. Инкубировать чашки при температуре (37 ± 1) °С, Время инкубации зависит от типа образца и целей исследования. Как правило, учёт результатов проводится через 24-48 ч.

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов проводят визуально по наличию характерных колоний:

- штаммы *H. influenzae* формируют слизистые, сочные, полупрозрачные, гладкие колонии сероватого цвета диаметром 1- 2 мм. Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического "мышинного" запаха.

- культура *S. pneumoniae* растёт в виде прозрачных, не склонных к слиянию колоний, которые могут быть как выпуклыми, так и плоскими с центральным углублением, диаметром до 0,5 мм. В зоне роста культуры наблюдается изменение цвета питательной среды до зелёного цвета.

- штаммы *N. meningitidis* формируют полупрозрачные, выпуклые с ровными краями колонии диаметром 1,0 - 1,5 мм.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Бутылки с Основой необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 25 °С. Флаконы с РД-ША и селективными добавками хранить герметично закрытыми при температуре (4±2) °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 выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар)» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.