

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОСТОВСКИЙ - НА- ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону
противочумный институт»
Роспотребнадзора



С.В. Титова

“23” ноября 2015г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению на изделие медицинское для диагностики in vitro

Питательная среда

**Плотная питательная среда для культивирования и выделения
холерного вибриона, готовая к использованию после переплавки,
Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС – агар)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Полное наименование изделия: «Плотная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона, готовая к использованию после переплавки, Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС – агар)».

1.2 Питательная среда относится к изделиям медицинского назначения для использования in vitro и применяется в клинической лабораторной диагностике (микробиологическая диагностика).

1.3. Питательная среда предназначена для выделения холерных вибрионов O1 и не O1 серогрупп от человека и из объектов окружающей

среды бактериологическим методом и культивирования штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп.

1.4. Питательная среда может применяться как в стационарных, так и в мобильных лабораториях в полевых условиях и даёт возможность получать оперативную информацию при проведении мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона и исследовании материала от людей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

2.1. Состав Питательной среды (из расчёта на 1 литр):

- панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД) (Протокол заседания Ученого Совета Ростовского-на-Дону противочумного института № 11 от 12.11.2004 г., дата утверждения директором института – 12.11.2004 г.; Пат. 2375441 Российская Федерация, МПК 8 С 12 N 1\16. Способ получения белкового гидролизата.) – 0,05 % (по аминному азоту);
 - натрий хлористый «ЧДА» (ТУ 4233-77) – 4,0 г;
 - натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-ти водный «ЧДА» (ГОСТ 4172-76) – 6,0 г;
 - агар микробиологический (ГОСТ 17206-96) – 13,0 г;
 - вода очищенная (ФС 42-2619-97) – до 1,0 л;
- pH готовой среды – $7,7 \pm 0,1$

К Питательной среде прилагается «Инструкция по применению» и «Паспорт» на поставляемую серию питательной среды.

2.2. Описание Питательной среды.

Питательная среда представляет собой приготовленную способом варки, отфильтрованную и стерилизованную методом паровой стерилизации под давлением смесь питательной основы – панкреатического перевара

пекарских дрожжей (ПППД), солей, воды очищенной, агара микробиологического.

Внешний вид Питательной среды: Питательная среда представляет собой студнеобразную массу жёлтого или светло-коричневого цвета.

2.3. Функциональные характеристики Питательной среды.

Один литр Питательной среды рассчитан на выделение штаммов холерного вибриона O1 и не O1 серогрупп в 20 исследуемых пробах или культивирование до 10 штаммов холерного вибриона (из расчета- по три чашки Петри диаметром 90 мм со средой на один штамм).

Расход Питательной среды на одно исследование при выделении штаммов холерного вибриона составляет 0,05 л; на культивирование одного штамма холерного вибриона 0,09-0,1 л.

Общее время проведения анализа одной пробы с целью выделения штаммов холерного вибриона с использованием Питательной среды – 12-18 часов. Общее время культивирования штаммов холерного вибриона на Питательной среде в зависимости от задач исследования – от 3 до 48 часов.

2.4 Принцип метода, положенный в основу работы Питательной среды.

В основу работы Питательной среды положена способность штаммов холерного вибриона обеспечивать свои питательные потребности за счет основных ее ингредиентов – питательной основы ПППД и солей в условиях слабощелочного pH, а за счет содержания в Питательной среде агара – вырастать в виде типичных для данных условий культивирования гладких, прозрачных или полупрозрачных, голубоватых в проходящем свете колоний, отличающихся от колоний других микроорганизмов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность Питательной среды в отношении тест-штаммов холерного вибриона *Vibrio cholera classical* P-1 (145), *V.cholerae* El Tor M-878,

V.cholerae non O1/non O139 P-9741 составляет 10 микробных клеток. Проведенные исследования показали, что аналогичная чувствительность была зарегистрирована в отношении 25 других штаммов холерного вибриона (в том числе, группы из трех штаммов *V.cholera* classical, группы из 10 штаммов *V.cholerae* El Tor, группы из восьми штаммов *V.cholerae* O139 и группы из четырех штаммов *V.cholerae* non O1/non O139). Результаты воспроизводимы. Коэффициент вариации 3,24%.

Показатель прорастания Питательной среды в отношении тест-штаммов холерного вибриона *Vibrio cholera* classical P-1 (145), *V.cholerae* El Tor M-878, *V.cholerae* non O1/non O139 P-9741 составляет $36,3 \pm 3,4$ микробных клеток. Проведенные исследования показали, что значения показателя прорастания, не выходящие за границы данного диапазона, были зарегистрированы в отношении 25 других штаммов холерного вибриона (в том числе, группы из трех штаммов *V.cholera* classical, группы из 10 штаммов *V.cholerae* El Tor, группы из восьми штаммов *V.cholerae* O139 и группы из четырех штаммов *V.cholerae* non O1/non O139). Результаты воспроизводимы. Коэффициент вариации 8,18 %.

Диаметр колоний тест-штаммов холерного вибриона *Vibrio cholera* classical P-1 (145), *V.cholerae* El Tor M-878, *V.cholerae* non O1/non O139 P-9741 через 12 часов культивирования на Питательной среде при 37 °C составляет $2,4 \pm 0,3$ мм. Проведенные исследования показали, что значения показателя диаметра колоний, не выходящие за границы данного диапазона, были зарегистрированы в отношении 25 других штаммов холерного вибриона (в том числе, группы из трех штаммов *V.cholera* classical, группы из 10 штаммов *V.cholerae* El Tor, группы из восьми штаммов *V.cholerae* O139 и группы из четырех штаммов *V.cholerae* non O1/non O139). Результаты воспроизводимы. Коэффициент вариации 6,22%.

Морфология колоний тест-штаммов холерного вибриона *Vibrio cholera* classical P-1 (145), *V.cholerae* El Tor M-878, *V.cholerae* non O1/non O139 P-9741 через 12 часов культивирования на Питательной среде при 37 °C типичная для холерного вибриона – колонии гладкие, прозрачные или полупрозрачные, голубоватые в проходящем свете. Проведенные исследования показали, что аналогичная морфология колоний была зарегистрирована в отношении 25 других штаммов холерного вибриона (в том числе, группы из трех штаммов *V.cholera* classical, группы из 10 штаммов *V.cholerae* El Tor, группы из восьми штаммов *V.cholerae* O139 и группы из четырех штаммов *V.cholerae* non O1/non O139). Результаты воспроизводимы.

Стабильность основных свойств тест-штаммов холерного вибриона *Vibrio cholera* classical P-1 (145), *V.cholerae* El Tor M-878, *V.cholerae* non O1/non O139 P-9741– не более двух атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колоний на каждой чашке с посевной дозой 1×10^2 м.к. Проведенные исследования показали, что показатель стабильности свойств был аналогичным и в отношении 25 других штаммов холерного вибриона (в том числе, группы из трех штаммов *V.cholera* classical, группы из 10 штаммов *V.cholerae* El Tor, группы из восьми штаммов *V.cholerae* O139 и группы из четырех штаммов *V.cholerae* non O1/non O139). Результаты воспроизводимы. Коэффициент вариации 6,00%.

Стерильность Питательной среды. Проведенные исследования 5% каждой серии Питательной среды показали отсутствие роста колоний посторонней микрофлоры на всех чашках Петри с Питательной средой после инкубации в условиях 37 °C в течение 5 суток. Результаты воспроизводимы. Коэффициент вариации менее 2%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения Питательной среды – класс 3 (ГОСТ Р 51088-2013).

4.2. Питательная среда при использовании ее по целевому назначению безопасна и не обладает токсическим воздействием.

4.3. При работе с Питательной средой по выделению или культивированию штаммов холерного вибриона следует соблюдать Санитарные Правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».

4.4. Выделение и культивирование штаммов холерного вибриона с использованием Питательной среды проводить только в лабораториях, соответствующих уровню биологической безопасности УББ-3.

4.5. При выделении и культивировании штаммов холерного вибриона с использованием Питательной среды обязательно применение средств индивидуальной защиты (СИЗ).

4.6. При работе с Питательной средой следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г) и ГОСТ Р 53079.2-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований.

4.7. Питательная среда предназначена только для лабораторной диагностики холеры *in vitro* и культивирования штаммов холерного вибриона.

5. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

5.1. Контроль качества Питательной среды проводят согласно ГОСТ Р 53133.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований», МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллёза»; МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры".

5.2. Достоверность результатов исследования зависит от соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур.

5.3. Процедура внутреннего контроля качества исследования включает контроль Питательной среды по физико-химическим показателям (внешний вид, прозрачность и цветность, концентрация водородных ионов – pH, аминный азот, общий азот, содержание хлорида натрия, углеводы, прочность агарового студня по Валенту) и биологическим показателям в отношении тест – штаммов холерного вибриона (чувствительности, показателю прорастания, диаметру колоний, морфологии колоний, стабильности основных биологических свойств тест-штаммов, стерильности).

Физико-химические показатели Питательной среды должны быть следующими:

- Внешний вид - студнеобразная масса жёлтого или светло-коричневого цвета;
- Прозрачность и цветность - Питательная среда должна быть слегка опалесцирующей, жёлтого или светло-коричневого цвета;
- Концентрация водородных ионов (pH) - $7,8 \pm 0,2$;
- Аминный азот - $0,05 \pm 0,005$ %;
- Общий азот - $0,16 \pm 0,02$ %;
- Содержание хлорида натрия - $0,86 \pm 0,04$ %;

- Углеводы - $0,007 \pm 0,0005 \%$;
- Прочность агарового студня (по Валенту) - 375 ± 25 г.

Тест - штаммы: *V. cholerae* classical P-1 (145), *V. cholerae* El Tor M-878 и *V. cholerae* non O1/ non O139 P-9741 находятся в коллекциях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора. Подготовку тест-штаммов и контроль Питательной среды по биологическим показателям проводят в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллёза». По своим биологическим показателям Питательная среда должна соответствовать следующим требованиям в отношении тест-штаммов холерного вибриона:

- Чувствительность - не ниже 10 м.к.;
- Показатель прорастания – не менее 30 % от расчётной посевной дозы 1×10^2 м.к. при наличии единичных колоний на всех трёх чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. (расчёт ведётся по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой);
- Диаметр колоний - на всех чашках не менее 1,0 мм;
- Морфология колоний – колонии гладкие, прозрачные (для *V. cholerae* nonO1 / non O139 P-9741 – полупрозрачные), голубоватые в проходящем свете;
- Стабильность основных биологических свойств тест-штаммов - не более двух атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колоний на каждой чашке с посевной дозой 1×10^2 м.к.;
- Стерильность – отсутствие на каждой чашке Петри с Питательной средой колоний посторонней микрофлоры в количестве более 2 после инкубации при 37 °С в течение пяти суток.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДОЙ

спирт этиловый ректификованный 96°;

пробирки биологические стеклянные;

предметные стёкла;

чашки Петри пластмассовые однократного применения Ø 90 мм;

вата гигроскопичная;

марля медицинская;

петли бактериологические;

горелка спиртовая;

пипетки стеклянные градуированные на 1, 2, 5, 10 мл;

стандартный образец мутности ОСО 42-28-86П;

0,9 % раствор натрия хлорида, забуференный 1/150 М фосфатным буфером pH 7,2±0,1;

агар Мартена pH 7,7±0,1;

среда Хью – Лейфсона;

среда Гисса с арабинозой;

среда Гисса с маннозой;

среда Гисса с сахарозой;

1 % пептонная вода pH 7,8;

щелочной агар pH 7,7-8,2;

среда Мёллера с лизином;

среда Мёллера с орнитином;

среда Мёллера с аргинином;

среда Мёллера без аминокислот (контроль)

0,2 % водный раствор трипофлавина;

шпатель Дригальского;

масло иммерсионное;

оптический микроскоп;

бумага фильтровальная;

1 % раствор генцианвиолета;

бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей;

микротест-система для ускоренного определения групп вибрионов по Хейбергу (МТС-Х);

системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов (СИБ). Набор диагностический № 1 для идентификации холерных вибрионов;

сыворотки диагностические холерные Огава и Инаба адсорбированные сухие для реакции агглютинации (РА);

карболовый фуксин Циля;

раствор Люголя;

термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;

холодильник бытовой;

электроплитка;

кастрюля эмалированная объёмом 5 л;

термометр стеклянный ртутный;

ножницы хирургические тупоконечные прямые 220 мм

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

7.1. Материал для бактериологического исследования с использованием Питательной среды.

Материалом для бактериологического анализа с использованием Питательной среды могут служить испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника и желчный пузырь); предметы, загрязненные испражнениями (постельное и нательное белье и др.); вода, ил, гидробионты, сточные воды, содержимое выгребных туалетов; смывы с объектов окружающей среды, пищевые продукты, мухи и др.

7.2. Процедура отбора проб анализируемого материала

Для отбора проб используют чистую стерильную посуду, не содержащую следов дезинфицирующих растворов. Стерилизацию посуды и других средств забора материала проводят автоклавированием, сухим жаром или кипячением в 2 %-м растворе пищевой соды.

Материал для исследования должен быть доставлен не позже, чем через 2 ч после его взятия. В случае удлинения сроков доставки используют транспортные среды. Наиболее удобной и достаточно эффективной является 1 %-я пептонная вода ($\text{pH } 8,4 \pm 0,1$).

В пептонную воду в качестве ингибитора сопутствующей флоры может быть добавлен теллурид калия из расчета 1:100000 - 1:200000 или моющее средство «Прогресс» в концентрации 0,1 - 0,2 %.

Среды во флаконах или пробирках, закрытых ватно-марлевыми пробками, рекомендуется хранить не более 2-х суток при температуре не выше $(10,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ при условии сохранения их стерильности. Целесообразно обеспечение стационаров и групп забора проб средами в закатанных флаконах.

Материал в количестве 1 - 2 г может быть доставлен на исследование нативным, в 1 %-й пептонной воде или другой транспортной среде.

При наличии у больного диареи материал забирают до начала этиотропной терапии в количестве 10 - 20 мл, у больных легкими формами - 1 - 2 г испражнений. От больных тяжелой формой материал направляют в лабораторию нативным и в 1 %-й пептонной воде. В транспортную среду вносят 1 - 2 мл или 1 - 2 г материала на 5 - 6 мл среды.

При вынужденном удлинении сроков доставки материала в лабораторию (длительное плавание, круиз и т.п.) можно использовать полоски фильтровальной (промокательной) бумаги. Жидкими испражнениями пропитывают полоску обычной плотной промокательной бумаги или другого гигроскопичного материала и герметично упаковывают в пластиковый пакет для предохранения от высыхания при транспортировании в лабораторию.

7.3. Способы отбора проб от больных холерой, вибрионосителей и контактных с ними лиц, секционного материала

Испражнения и рвотные массы в количестве 10 - 20 мл собирают в стерильную посуду стерильными ложками или стеклянными трубками с

резиновой грушей из индивидуального судна, на дно которого помещают меньший по размеру сосуд (лоток), удобный для обеззараживания кипячением.

Для взятия материала у больных с обильным водянистым стулом можно использовать резиновый катетер, один конец которого вводят в прямую кишку, а другой опускают в банку. Жидкие испражнения стекают в сосуд свободно или при легком массаже брюшной стенки.

Стерильный ректальный ватный тампон из гигроскопической ваты вводят в прямую кишку на глубину 5 - 6 см, собирают им содержимое со стенок кишечника и опускают во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Стандартную стерильную петлю из алюминиевой проволоки перед забором материала смачивают стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида и вводят в прямую кишку на 5 - 6 см. Взятый материал переносят во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Желчь берут при дуоденальном зондировании в лечебном учреждении. В отдельные пробирки собирают две порции: из желчного пузыря и желчных протоков (В и С). Материал доставляют нативным.

От умерших с подозрением на холеру берут отрезки (длиной около 10 см) верхней, средней и нижней частей тонкой кишки, разрез производят между двойными лигатурами, предварительно наложенными на оба конца изымаемого участка кишечника. Желчный пузырь после перевязки протока извлекают целиком. Содержимое кишечника и желчь от трупа можно взять стерильным шприцем с толстой иглой в объеме до 10 мл и перенести в емкость с 1 %-й пептонной водой. Взятые образцы органов трупа укладывают отдельно в стерильные банки.

7.4. Отбор проб из объектов окружающей среды

Воду (питьевую, из поверхностных водоемов и др.) для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой.

Из водопроводных кранов пробы воды берут после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин при полном открытии крана.

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10?10 см, сложенных в 10 - 15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через сутки помещают в стерильную банку и доставляют в лабораторию.

Гидробионтов (рыб, лягушек и др.) отлавливают из водоемов любым способом и в закрытых банках, ведрах и других сосудах доставляют в лабораторию.

Ил и фитопланктон (водоросли) также помещают в стерильные банки и транспортируют в лабораторию.

Исследовать зоопланктон (дафнии, циклопы и др.) можно групповым методом, объединяя в один посев 10 - 30 образцов, отловленных на одном участке водоема. В этом случае они могут быть доставлены в одном сосуде. При исследовании рыб берут содержимое желудка и жабры.

Смывы с различных объектов окружающей среды берут ватным или марлевым тампоном, смоченным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, с

Исследовать зоопланктон (дафнии, циклопы и др.) можно групповым методом, объединяя в один посев 10 - 30 образцов, отловленных на одном участке водоема. В этом случае они могут быть доставлены в одном сосуде.

поверхности площадью 10?10 см. Тампон опускают во флакон или пробирку с 1 %-й пептонной водой.

Для сбора мух расставляют мухоловки, в которые наливают 1 %-ю пептонную воду с 1 % сахара.

Остатки пищи в очаге и по показаниям пищевые продукты отбирают по 200 г плотных и 0,5 л жидких, помещают в стеклянную посуду и закрывают. При необходимости в жидкие продукты добавляют основной пептон до 1 %-й концентрации.

8. ПОДГОТОВКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА).

Флаконы с Питательной средой помещают в эмалированную кастрюлю с многослойной марлевой салфеткой и наполненную водой, которую ставят на включённую в сеть электро- или газовую плитку, варочную панель (водяная баня). После того, как содержимое флаконов расплавится и станет однородным (т.е. без комочков), их остужают до 50 - 55°C. Затем флаконы с Питательной средой асептично при помощи ножниц освобождают от алюминиевых колпачков и резиновых пробок, меняя последние на стерильные ватно-марлевые. Далее осуществляют асептично розлив Питательной среды в чашки Петри стеклянные или пластмассовые диаметром 90 мм из расчета 30-50 мл на одну чашку. Чашки Петри с разлитой в них средой подсушивают от конденсата в термостатах, маркируют в зависимости от задач исследования и используют для анализа проб на наличие холерного вибриона или для культивирования штаммов холерного вибриона.

9. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

9.1. Исследование проб от больных и вибрионосителей, секционного материала с использованием Питательной среды.

Іэтап

Испражнения, рвотные массы больных, а также содержимое кишечника, желчного пузыря и суспензию кусочков слизистой тонкого кишечника трупа в объёме 0,5 - 1,0 мл засевают пипеткой в 50 - 100 мл накопительной среды, петлей - на Питательную среду и одну из элективных сред (СЭДХ, TCBS).

Материал от подозреваемых на вибрионоительство засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100 мл - при групповых, объединяя в один флакон по 0,5 - 1,0 мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в редких случаях при проведении массовых обследований на вибрионоительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1 %-й пептонной воды, полностью используют для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1 %-й пептонной воды во флаконе, и доставки его не позже 2-х ч после забора пробы, флакон помещают в термостат на 6 ч для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засевают в 50 мл 1 %-й пептонной воды.

ІІэтап (через 6 - 8 ч от начала исследования)

С первой среды накопления делают высев на Питательную среду и одну из элективных сред и в 5 - 8 мл второй среды накопления. Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.

III этап (через 12 - 16 ч от начала исследования)

Высев со второй среды накопления на Питательную среду.

В случае необходимости ускорения хода анализа материала от больного, подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний с Питательной среды, засеянной в начале исследования, можно начинать уже на этом этапе, в остальных случаях - на следующем.

IV этап (через 18 - 24 ч от начала исследования)

Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах на Питательной среде нативного материала, а также в посевах из 1-й и 2-й накопительных сред.

9.2. Исследование объектов окружающей среды

Схема анализа объектов окружающей среды отличается от схемы исследования материала от больных только на I этапе.

а) Вода поверхностных водоемов и водопроводная

В зависимости от времени доставки пробы возможны следующие варианты посевов с целью первичного накопления вибрионов:

- к исследуемой воде добавляют раствор основного пептона до 1 %-й концентрации, определяют рН, в случае необходимости подщелачивают 10 %-м раствором едкого натрия до рН $8,4 \pm 0,1$. Время инкубации в 1-й среде накопления - 8 - 10 ч. Объем 2-й среды накопления - 10 мл; время инкубации в среде без теллурита калия - 6 ч, а с теллуридом калия - 18 - 20 ч;
- в исследуемую воду добавляют раствор основного пептона до 1 %-й концентрации и теллурид калия из рабочего разведения 1:1000 до концентрации 1:100000 или 1:200000 в соответствии с данными проверки.

Устанавливают pH $8,4 \pm 0,1$. Время инкубации 18 - 24 ч; вторая среда накопления - 10 мл среды без теллурита калия, время инкубации 6 - 8 ч;

· исследование проб воды можно также проводить с использованием в качестве ингибитора посторонней флоры моющего средства «Прогресс» в концентрации 0,1 - 0,2 %; после добавления основного раствора пептона до 1 %-й концентрации и установления щелочной реакции пробы сохраняют при комнатной температуре (не выше 25 °C) до утра (первая среда накопления). В начале следующего дня засевают 5 мл поверхностного слоя в 100 мл 1 %-й пептонной воды (вторая среда накопления) и делают высев на щелочной агар; высев со второй среды накопления производят через 6 - 8 ч инкубации;

· воду фильтруют через мембранные фильтры № 2 или 3, смыв с которых сеют в накопительную среду и на агаровые пластинки.

б) Хозяйственно-бытовые сточные воды

Сточные воды, доставленные в объеме 1 л, фильтруют через бумажный или матерчатый фильтр для освобождения от механических примесей (при необходимости).

После добавления к пробам основного раствора пептона до 1 %-й концентрации устанавливают pH $8,4 \pm 0,1$ и инкубируют в объемах по 500 мл 8 - 10 ч (1 среда накопления) или с добавлением теллурита калия 1:100000 (1:200000) - 18 - 24 ч.

При заборе сточных вод марлевыми тампонами последние помещают в широкогорлые колбы или банки с накопительной средой (500 мл) и далее исследуют, как указано выше.

в) Гидробионты

Лягушку непосредственно перед исследованием обездвигивают уколом иглы в спинной мозг и фиксируют на препаровальной доске брюшком вверх.

Поверхность брюшка обрабатывают спиртом и ножницами делают медиальный разрез. Желчный пузырь отсекают от печени, разрезают и делают отпечаток на пластинке щелочного агара. Остатки желчи вместе с желчным пузырем помещают во флаконы с 50 - 100 мл 1 %-й пептонной воды. Содержимое желудка засевают в 1 %-ю пептонную воду, а внутренней поверхностью стенки делают отпечатки на агаровые пластинки. Посев кишечника делают таким же образом, отсекая несколько петель в верхнем, среднем и нижнем отделах кишечника.

У крупных рыб в том же порядке засевают в накопительную среду содержимое желчного пузыря, желудка, кишечника и жабры. Мелких рыб (мальков) измельчают ножницами по 10 - 20 экз. в одной пробе и делают посев суспензии петель на чашку с агаром и в 1 %-ю пептонную воду.

Дафний, циклопов и других рачков, так же, как и фитопланктон, растирают в ступке и засевают петель в 1 %-ю пептонную воду.

У раков исследуют кишечник и жабры, делая посев содержимого в среду накопления и слизистой стенки - отпечатком на агаровую среду.

г) Пищевые продукты

Безалкогольные напитки исследуют тем же методом, что и воду.

Молоко в количестве 5 мл сеют в 50 - 100 мл среды накопления или к 0,5 л молока добавляют основной раствор пептона до 1 %-й концентрации его в молоке. Другие молочные продукты (кефир, сметану, творог, мороженое и т.д.) в количестве 5 - 10 мл засевают в 1 %-ю пептонную воду.

Из твердых пищевых продуктов берут навеску 25 г, растирают в стерильной ступке с 2 - 3 г кварцевого песка и физиологическим раствором, а затем переносят в 125 мл накопительной среды и петель на агаровые среды.

Масло засевают в жидкую среду накопления в количестве 5 - 10 г, размягчив его в термостате, или делают посев смыва с поверхности его кусков.

После посева продукта устанавливают рН среды $8,4 \pm 0,1$.

д) Смывы с объектов внешней среды и мух засевают в 1 %-ю пептонную воду и исследуют по обычной схеме.

10. УЧЕТ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА ПРОБ НА НАЛИЧИЕ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Учёт результатов анализа проводят по наличию колоний с характерной для холерного вибриона морфологией согласно Методическим указаниям: МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры", а также МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллёза».

11. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

После применения Питательной среды объекты исследования и материалы обеззараживают и утилизируют в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности».

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

12.1. Транспортирование Питательной среды должно производиться всеми видами крытого транспорта в специальных транспортных термоизоляционных контейнерах или рефрижераторах при температуре от 2 до 8⁰С с соблюдением санитарно-гигиенических требований и условий обеспечения сохранности продукта при транспортировке. Допускается транспортировка Питательной среды при температуре от 9 до 25⁰С в срок не более 7 суток.

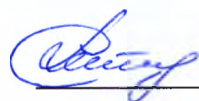
12.2. Хранение Питательной среды должно осуществляться в упаковке предприятия - производителя в сухом месте при температуре от 2 до 8⁰С в течение всего срока годности. Замораживание флаконов с Питательной средой не допускается.

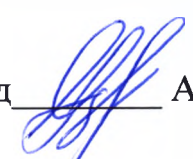
12.3. Срок годности - 1 год.

12.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению Питательной среды.

Рекламации на качество препарата в течение гарантийного срока следует направлять в адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, тел./факс (863) 240-27-03; E-mail: plague@aaanet.ru.

Директор ФКУЗ
«Ростовский-на-Дону
противочумный институт»
Роспотребнадзора

 С.В. Титова

Заведующий лабораторией питательных сред  А.Б. Мазрухо.

В настоящем документе
прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 21
листов
Директор Института
Титова С.В.

