

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГУН
Государственный научный центр при-
кладной микробиологии и
биотехнологии

И.А. Дятлов
« 8 » _____ 2007 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований
«Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (Агар Эндо-ГРМ)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Агар Эндо-ГРМ» предназначен для бактериологических целей при диагностике инфекционных заболеваний «in vitro».

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

«Агар Эндо-ГРМ» представляет собой смесь сухих компонентов в виде мелкодисперсного гигроскопичного порошка сиреневого цвета.

Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает питательные потребности для роста, дифференциации и ингибиции отдельных видов микроорганизмов.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

«Агар Эндо-ГРМ» представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки.....	12,0
Дрожжевой экстракт	1,0
Натрия хлорид	3,4
Д (+)-лактоза, 1-водная	10,0
Натрия сульфит безводный	0,8
Натрия фосфат 2-зам.12 водный	0,5
Фуксин основной для микробиологических целей ...	0,2
Агар микробиологический	10,0±3,0

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

«Агар Эндо-ГРМ» обеспечивает на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов *Shigella sonnei* «S form», *Shigella dysenteriae* I 1362, *Escherichia coli* 3912/41 (055:K59), *Escherichia coli* 168/59 (0111:K58) через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ при посеве по 0,1 мл микробной взвеси культуры каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} , разбавленного стерильным 0,9 %-ным раствором хлористого натрия в соотношении 1:1 (условно разведение 10^{-7}).

Колонии: *S. dysenteriae* I 1362 бесцветные, круглые, прозрачные, диаметром 1,0-1,5 мм;

Колонии *E. coli* 3912/41 (055:K59) - круглые, малинового цвета с металлическим блеском, диаметром 2,0-3,0 мм;

Колонии *S. sonnei* «S form» бесцветные или слегка розового цвета, со слабо выраженным центром, круглые, прозрачные, диаметром 1,5-2,5 мм;

Колонии *E. coli* 168/59 (0111:K58) - круглые, малинового цвета, металлический блеск колоний может быть неясно выражен, диаметром 1,5-2,5 мм.

Дифференцирующие свойства среды. Питательная среда должна обеспечивать четкую дифференциацию шигелл от эшерихий на всех засеянных чашках при посеве 0,1 мл каждой микробной смеси *S. sonnei* «S form» и *E. coli* 168/59 (0111:K58), *S. dysenteriae* I 1362 и *E. coli* 3912/41 (055:K59) из разведения 10^{-6} через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Ингибирующие свойства среды. Питательная среда должна полностью подавлять рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* Wood-46 на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-1} через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Соблюдение «Правил 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.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные вместимостью – 10 мл
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл

- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Чашки Петри стерильные
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Объекты исследований в санитарной и клинической микробиологии.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования образцов проводятся по соответствующим Методическим указаниям и ГОСТам.

7.1. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление «Агара Эндо-ГРМ».

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2-3 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова доводят до кипения, охлаждают до температуры 45-50 °С и разливают в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм. После застывания среды чашки подсушивают.

Готовая питательная среда в чашках Петри прозрачная, розового цвета. Среду необходимо использовать в день приготовления. Хранить до посева в темноте !

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие характерно окрашенных колоний энтеробактерий на плотной питательной среде в результате роста культур, выделенных из исследуемых образцов регистрируют визуально.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения достоверных результатов посевы образцов производить не менее, чем в трех повторностях.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

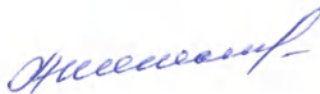
«Агар Эндо-ГРМ» необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С.

Срок годности – 2 года.

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

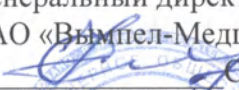
По вопросам, касающимся качества «Агара Эндо-ГРМ» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.

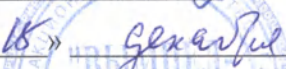
Зам. директора
по научно-производственной работе



А.П. Шепелин

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ЗАО «Вымпел-Медцентр»
 С.П. Кондрашов

« 18 »  2006 г.



87
казом Минздрава СССР от 22.04.85 г., № 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений".

Лактозоотрицательные энтеробактерии на агаре Эндо-ГРМ образуют прозрачные (полупрозрачные) бесцветные колонии (могут образовывать колонии бледно-розового цвета). Лактозоположительные энтеробактерии образуют колонии малинового цвета с металлическим блеском или без него. На среде ингибируется рост грамположительной микрофлоры.

Препарат расфасован по 400 г в полиэтиленовые банки.

Препарат необходимо хранить в герметически закрытой упаковке в темном месте в помещении с относительной влажностью воздуха не более 60 % и температурой от 2 до 30 °С.

Срок годности препарата 3 года.

Рекламации на качество препарата в течение срока годности следует направлять в адрес предприятия-изготовителя.

Копию рекламации направляют в адрес Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича по адресу:

121002, г. Москва, Сивцев-Вражек, д.41, тел. 241-39-22.

Директор ГНЦ ПМ



Н.Н. Ураков

Состав:

панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) по ТУ 480-00001927-27-93.....	12,0 г
экстракт пекарных дрожжей (Yeast Extract, Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция)	1,0 г
натрий хлористый по ГОСТ 4233-77.....	3,4 г
Д- (+)-лактоза, 1-водная по ТУ 6-09-2293-79.....	10,0 г
сульфит натрия безводный по ГОСТ 5644-75	0,8 г
натрий фосфорнокислый 2-зам. 12 водный по ГОСТ 4172-76.....	0,5 г
фуксин основной для микробиологических целей по ТУ 6-09-3804-82.....	0,2 г
агар микробиологический по ГОСТ 17206-84 или агар импортный, соответствующий ГОСТ 17206-84 (10,0±2,0) ^{*)} г	

Расчет на 1 л воды дистиллированной по ГОСТ 6709-72.

Описание. Мелкодисперсный порошок сиреневого цвета, гигроскопичен, светочувствителен.

Растворимость. Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, должен полностью растворяться при перемешивании в 1 л дистиллированной воды при кипячении в течение 3 мин. Определение растворимости проводят визуально.

Прозрачность и цветность. Раствор препарата, полученный как указано на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, должен быть прозрачным, розового цвета. Определение проводят визуально.

рН От 7,2 до 7,6. (2 % раствор, потенциометрически; ГФ XI, вып.1, с. 113).

Потеря в массе при высушивании.

Около 0,15-0,20 г препарата (точная навеска) сушат при температуре (100±2) °С в течение 2 часов. Потеря в массе должна быть не более 7 % (ГФ XI, вып.1, с. 176).

^{*)} Варьирование величины связано с различной прочностью студня агара

Азот аминогрупп аминокислот и низших пептидов.

(1,4±0,3) %. Определение проводят по ФС 42-344 ВС-90, используя 10 мл экстракта препарата, приготовленного путем добавления к 1,00 г сухого препарата 100 мл дистиллированной воды, настаивания в течение 1 ч при температуре 18-25 °С и последующего фильтрования.

Натрия хлорид (15,0±2,5) %. Определение проводят по ФС 42-344 ВС-90, используя 0,5 мл экстракта, приготовление которого изложено в предыдущем разделе.

Прочность студня среды (250±30) г. Определение проводят в соответствии с "Методическими указаниями по применению физико-химических методов контроля питательных сред" (М., 1977). Для определения используют препарат в количестве, указанном на этикетке, из расчета приготовления 100 мл конкретной серии питательной среды.

Показатель чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов. Питательная среда должна обеспечивать на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов *Shigella sonnei* "S form", *Shigella dysenteriae* I 1362, *Escherichia coli* 3912/41 (055:K59), *Escherichia coli* 168/59 (0111:K58) через 18-20 ч инкубации при температуре (37±1) °С при посеве по 0,1 мл микробной взвеси культуры каждого тест-штамма из разведения 10⁻⁶, разбавленного стерильным 0,9 %-ным раствором хлористого натрия в соотношении 1:1 (условно разведение 10⁻⁷).

Колонии: *S. dysenteriae* I 1362 бесцветные, круглые, прозрачные, диаметром 1,0-1,5 мм;

Колонии *S. sonnei* "S form" бесцветные или слегка розового цвета, со слабо выраженным центром, круглые, прозрачные, диаметром 1,5-2,5 мм;

Колонии *E. coli* 3912/41 (055:K59) - круглые, малинового цвета с металлическим блеском, диаметром 2,0-3,0 мм;

Колонии *E. coli* 168/59 (0111:K58) - круглые, малинового цвета, металлический блеск колоний может быть неявно выражен, диаметром 1,5-2,5 мм.

Колонии *E. coli* 168/59 (0111:K58) - круглые, малинового цвета, металлический блеск колоний может быть неясно выражен, диаметром 1,5-2,5 мм.

Определение показателей чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов:

1. Приготовление питательной среды

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2-3 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова доводят до кипения, охлаждают до температуры 45-50 °С и разливают в стерильные чашки Петри по ГОСТ 25336-82 или ТУ 64-2-49-79 слоем 5-6 мм. После застывания среды чашки подсушивают при температуре (37±1) °С в течение 40-60 мин.

Готовая питательная среда в чашках Петри прозрачная, розового цвета. Среду необходимо использовать в день приготовления. Хранить до посева в темноте !

2. Подготовка тест-штаммов для контроля питательной среды.

Тест-штаммы *S. sonnei* "S form", *S. dysenteriae* I 1362, *E. coli* 3912/41 (055:K59), *E. coli* 168/59 (0111:K58) получают из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Используемые для контроля среды тест-штаммы должны быть типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Тест-штаммы хранят при температуре 2-8 °С в лиофилизированном состоянии; или на среде Романова (Сборник инструкций, утвержденный приказом Минздрава СССР № 31 от 13.01.83) или на питательной среде следующего состава (г/л):

питательный бульон сухой (СПБ) по ФС 42-	15,0
или ГРМ-бульон по ФС 42-3378-97	20,0
агар микробиологический по ГОСТ 17206-84	3,0
вода дистиллированная	1,0 л

pH 7,2±0,2

Пересевы культур со среды хранения на среду выращивания и вновь на среду хранения проводят через каждые 3 месяца, но не более четырех раз.

I пассаж

Лиофилизированные культуры тест-штаммов *S. sonnei* "S form", *S. dysenteriae* I 1362, *E. coli* 3912/41 (055:K59), *E. coli* 168/59 (0111:K58) из ампул или со среды хранения высевают в пробирку по ГОСТ 25336-82 с питательным бульоном и на чашку Петри с питательным агаром (СПА по ФС 42- или ГРМ-агаром по ФС 42-3377-97) и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч.

Выросшую на указанных средах культуру каждого тест-штамма проверяют визуально на чистоту роста и отсутствие диссоциации ("Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям". М., 1980).

II пассаж:

Культуры тест-штаммов *S. sonnei* "S form", *S. dysenteriae* I 1362, *E. coli* 3912/41 (055:K59), *E. coli* 168/59 (0111:K58) пересевают в две пробирки и чашку Петри с питательным агаром (в случае отсутствия роста на плотной среде для последующего пассажа используют культуру, выращенную в бульоне). После инкубации посевов в течение 18-20 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ выросшие культуры проверяют на чистоту роста и используют для контроля.

Готовят стандартную взвесь культуры каждого тест-штамма, соответствующую 10 единицам по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-59-85), с использованием стерильного 0,9 %-ного раствора натрия хлористого. Полученные взвеси культур десятикратными разведениями (4,5 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлористого с 0,5 мл микробной взвеси) доводят до разведения 10^{-6} . Микробную взвесь каждой культуры из разведения 10^{-6} разбавляют в соотношении 1:1 стерильным 0,9 %-ным раствором натрия хлористого (условно разведение 10^{-7}) и используют для контроля среды. В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят новой стерильной пипеткой вместимостью 1 мл 2 класса точности по ГОСТ 20292-91.

3. Посев и учет результатов.

На две чашки Петри с агаром Эндо-ГРМ засевают из разведения 10^{-7} по 0,1 мл каждой микробной взвеси тест-штамма *S. sonnei* "S form", *S. dysenteriae* I 1362, *E. coli* 3912/41 (055:K59) и *E. coli* 168/59 (0111:K58). Через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ визуально учитывают характер роста культур.

Дифференцирующие свойства среды. Питательная среда должна обеспечивать четкую дифференциацию шигелл от эшерихий на всех засеянных чашках при посеве 0,1 мл каждой микробной смеси *S. sonnei* "S form" и *E. coli* 168/59 (0111:K58), *S. dysenteriae* I 1362 и *E. coli* 3912/41 (055:K59) из разведения 10^{-6} через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Определение дифференцирующих свойств среды:

Приготовление питательной среды и подготовка тест-штаммов изложены в предыдущем разделе пп.1 и 2.

Из разведения 10^{-6} смешивают равные объемы микробных взвесей тест-штаммов *S. sonnei* "S form" и *E. coli* 168/59 (0111:K58), *S. dysenteriae* I 1362 и *E. coli* 3912/41 (055:K59).

2. Посев и учет результатов

По 0,1 мл микробной смеси *S. sonnei* "S form" и *E. coli* 168/59 (0111:K58), *S. dysenteriae* I 1362 и *E. coli* 3912/41 (055:K59) из разведения 10^{-6} засевают на 2 чашки Петри с агаром Эндо-ГРМ (в посевной дозе около 50 микробных клеток каждого штамма). Через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ визуально отмечают наличие дифференциации по цвету колоний лактозоотрицательных шигелл от лактозоположительных эшерихий.

Показатель ингибиции. Питательная среда должна полностью подавлять рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* Wood-46 на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-1} через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Определение показателя ингибиции:

1. Приготовление питательной среды изложено в п. 1 раздела "Показатель чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов".

2. Подготовка тест-штамма для контроля среды

Тест-штамм *S. aureus* Wood-46 получают из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Используемый для контроля среды тест-штамм должен быть типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Условия хранения и подготовку тест-штамма *S. aureus* Wood-46 для контроля питательной среды проводят в соответствии с п. 2 раздела "Показатель чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов". Для контроля среды используют микробную взвесь культуры из разведения 10^{-1} .

3. Посев и учет результатов.

По 0,1 мл микробной взвеси тест-штамма *S. aureus* Wood-46 из разведения 10^{-1} засевают на две чашки Петри с агаром Эндо-ГРМ и 2 чашки Петри с питательным агаром. Через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ визуально учитывают результаты. На агаре Эндо-ГРМ рост тест-штамма *S. aureus* Wood-46 должен отсутствовать; на питательном агаре должен наблюдаться сплошной рост культуры.

Упаковка. По 400 г в банке вместимостью 500 мл из полиэтилена высокого давления по ГОСТ 16337-77 базовой марки 15803-020, рецептура добавки 07 светозащищающая, с крышкой из того же полиэтилена.

Банки должны быть герметично завинчены самогерметизирующимися крышками типа 1.1.40 по ОСТ 64-2-218-84.

Крышки банок должны быть герметизированы парафино-канифольной смесью (соотношение парафина по ГОСТ 23683-79 и канифоли по ГОСТ 19113-84 - 85:15).

Единица измерения 1 кг.

Банки должны быть уложены в ящики из гофрированного картона по ГОСТ 13841-95 (ящик № 40) или по ГОСТ 13516-86 (ящики № 50, 51, 52) в один ряд по 20 шт.

В каждый ящик вкладывают инструкцию по применению и упаковочный лист. Содержание упаковочного листа должно быть в соответствии с РД 42-28-36-90. Масса нетто должна быть не более 8 кг.

Маркировка. На каждую банку должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. На этикетке банки должно быть указано: наименование и адрес предприятия-изготовителя, наименование продукции на русском и английском языках, состав препарата, способ приготовления, номер серии, контрольный номер, масса упаковочной единицы, срок годности, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код. Графическое оформление маркировки банок по РД 42-28-36-90.

Маркировка транспортной тары по ГОСТ 14192-77. На ящике должна быть предупредительная надпись "БИОПРЕПАРАТЫ!".

Транспортирование. Всеми видами крытого транспорта.

Хранение. В герметически закрытой упаковке в темном месте в помещении с относительной влажностью воздуха не более 60 % и температурой от 2 до 30 °С

Срок годности -3 года.

Назначение - выделение энтеробактерий из исследуемого материала и их дифференциация по признаку ферментации лактозы.

Примечание: Реактивы, титрованные растворы, индикаторы, приведенные в настоящей ВФС, описаны в соответствующих разделах Госу-

дарственной фармакопеи XI изд. вып. 2.

Директор ГНЦ
прикладной микробиологии

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Исполнительный директор Отделения
"Питательные среды"

Зам. директора по научно-производственной
работе

Главный технолог

Начальник ЦЗЛ

Технолог 1 категории

Научный сотрудник

Инженер I категории

Начальник ОБТК

Директор ГИСК им. Л.А. Тарасевича
руководитель Национального
органа контроля МИБП

Зав. лаборатории стандартизации
НД ГИСК им. Л.А. Тарасевича

Председатель Государственного
Фармакопейного комитета

Главный ученый секретарь
Государственного Фармакопейного
комитета

И.И. Марчихина
 10 10 1997 г

М.Н. Мартовецкий М.Н. Мартовецкий

Е.Н. Миронова Е.Н. Миронова

И.И. Марчихина И.И. Марчихина

Л.Н. Шолохова Л.Н. Шолохова

Н.П. Приймак Н.П. Приймак

Н.К. Селезнева Н.К. Селезнева

Т.И. Василенко Т.И. Василенко



Н.В. Медунин Н.В. Медунин
"23" 03 1998 г

Н.А. Озерцовский Н.А. Озерцовский
20.03.98

В.Д. Багирова В.Д. Багирова
"23" 04 1998 г



ЛИСТ-ЗАВЕРИТЕЛЬ ДЕЛА № _____

В деле подшито и пронумеровано 96 (Десять шесть) листов,
(цифрами и прописью)

в том числе:

литерные номера листов _____;

пропущенные номера листов _____

+ листов внутренней описи _____

Особенности физического состояния и формирования дела	Номера листов
1	2

Наименование должности
работника

Дата 01.08.2012


(подпись)


(расшифровка подписи)