

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
Государственный научный центр при-
кладной микробиологии и
биотехнологии



М.А. Дятлов

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для бактериологических исследований
«Питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллёза сухой
(Бруцеллагар)» по ТУ 9398-170-78095326-2012

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллёза сухой (Бруцеллагар)» по ТУ 9398-170-78095326-2012 предназначен для культивирования бруцелл и выделения их из клинического материала при бактериологическом исследовании.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов состоит из одной банки с Бруцеллагаром и 12 флаконов с селективными добавками (СД 1 и СД 2), упакованных в картонную коробку.

Бруцеллагар выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г, СД 1 и СД 2 во флаконах по 0,005 г и 0,01 г соответственно.

Бруцеллагар представляет собой смесь сухих компонентов в виде мелкодисперсного гигроскопичного порошка светло-коричневого цвета.

СД 1: 6 флаконов с полимиксином В сульфат – мелкодисперсный порошок белого цвета.

СД 2: 6 флаконов с афотерицином В – пористая масса желтого цвета.

2.1. Принцип действия

Совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает питательные потребности для роста бруцелл и других высокотребовательных микроорганизмов.

2.2. Состав набора

Бруцеллагар представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ)	7,5
Пептон мясной	7,5
Панкреатический гидролизат казеина (ПГК)	10,0
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	5,0
Дрожжевой экстракт	3,0
Д-глюкоза	2,0
Натрий хлористый	3,5
Тиамин хлорид	0,005
meso-Erythritol	0,01
Натрий пироксернистокислый (натрия метабисульфит)	0,1
Агар микробиологический	10,0±3,0
СД 1, г/л:	
Полимиксин В сульфат	0,005
СД 2, г/л:	
Амфотерицин В	0,01

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфическая активность питательной среды.

Специфическая активность Набора реагентов оценивается по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств контрольных тест-штаммов при росте на приготовленной питательной среде (Бруцеллагар с СД1 и СД 2).

Питательная среда с СД 1 и СД 2 должна обеспечивать на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов *Brucella abortus* 19BA, *Brucella melitensis* 16 M, *Brucella suis* 1330 не позднее 48-72 ч инкубации при температуре (37±1)°C при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведений 10⁻⁶, 10⁻⁷ (100 м.к. и 10 м.к. соответственно).

3.2. Ингибирующие свойства питательной среды.

Питательная среда с СД 1 и СД 2 должна полностью подавлять рост тест-штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* 60193 при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁴ не позднее 48-72 ч инкубации при температуре (37±1)°C.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения питательной среды – класс 3 (в соответствии с Приказом МЗ РФ №4н от 06.06.2012)

4.2. При анализе исследуемого материала – соблюдение требований СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП

1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Уничтожение приготовленной питательной среды после проведения биологического исследования 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 $(126 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

4.3. Серии набора реагентов, пришедшие в негодность, серии с истекшим сроком годности, подлежат уничтожению в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «А» - (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам) **любым способом, предотвращающим повторное использование.** Упаковка (полиэтиленовые банки, флаконы) после полного израсходования их содержимого, подлежит утилизации в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «А».

4.4. Утилизация (уничтожение) осуществляется предприятиями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях с соблюдением обязательных требований нормативной документации по охране окружающей среды. Персонал, осуществляющий уничтожение изделий должен соблюдать правила безопасности проведения способа уничтожения.

4.5 Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной медицинской организации, использующей в своей работе медицинские изделия. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации. Ответственность за уничтожение изделия несут субъекты обращения изделий.

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

Клиническим материалом для отбора проб, предназначенных для дальнейшего исследования на бруцеллез, от лиц с подозрением на бруцеллез и больных людей в зависимости

от клинической формы болезни являются: кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость, пунктат из лимфатических узлов, моча, желчь, суставная жидкость (при артритах), гной (при абсцессах), мокрота, грудное молоко.

Отбор проб клинического материала для исследования, его упаковку и транспортирование осуществляет медицинский персонал в соответствии с требованиями МУ 3.1.7.3402-16 (п.п. 9.1, 9.3) и других действующих нормативных правовых, методических документов по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), по порядку учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Материал от больных с подозрением на бруцеллез отбирают при поступлении больного до начала антибиотикотерапии.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования на бруцеллез могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским или биологическим образованием, окончившие соответствующие курсы профессиональной переподготовки по специальности "Бактериология" с основами безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп, не имеющие противопоказаний к вакцинации против бруцеллеза, допущенные к работе с ПБА II-IV групп приказом руководителя учреждения.

7.1 Приготовление Бруцеллагара для культивирования бруцелл.

Препарат в количестве, указанном на этикетке, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят в течение 3 мин до полного расплавления агара и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

7.2 Приготовление Бруцеллагара с селективными добавками для выделения бруцелл.

Для приготовления 1 л среды с селективными добавками во флаконы с СД 1 и СД 2 наливают по 5 мл дистиллированной воды, вносят в стерильный, охлажденный до температуры 50-55 °С Бруцеллагар (п. 7.1), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Готовая питательная среда непрозрачная коричневого цвета с темно-коричневыми вкраплениями.

Готовую среду можно использовать в течение 7 сут после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С. Контроль приготовленной среды осуществляют в соответствии с МУК 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

7.3. Посев исследуемого материала проводят в соответствии с . МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза», МУК 4.2.3010-12

«Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»

Работа по выделению и дифференциации бруцелл из исследуемого материала должна проводиться в условиях, исключающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов окружающей среды, в строгом соответствии с требованиями нормативных правовых и методических документов по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности).

Исследуемый материал, подготовленный для посева (после обогащения в бульоне), вносят соответственно на две чашки Петри с Бруцеллагаром с СД 1 и СД 2, равномерно распределяют микробную взвесь покачиванием чашек по всей поверхности. Инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 72 ч.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят через 72 ч инкубации визуально учитывая наличие и характер роста бруцелл - выпуклые, гладкие, бесцветные, мутноватые, круглые колонии диаметром 1,0-1,5 мм.

Необходимо учитывать, что полученные результаты не являются единственным, определяющим диагноз признаком и требуют дополнительной информации для принятия медицинского решения.

Для определения принадлежности выделенных культур к роду *Brucella* используют следующие методы: изучение морфологии колоний, микроскопия окрашенных препаратов по Граму или Козловскому, люминесцентная микроскопия и проба со специфической сывороткой в реакции агглютинации на стекле, выявление родоспецифичных локусов методом ПЦР, ИФА.

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

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Набор реагентов необходимо хранить на складе в герметично закрытой упаковке:

- банку с сухой средой при температуре от 2 до 30 $^\circ\text{C}$;
- коробку с флаконами (СД 1 и СД 2) при температуре 2-8 $^\circ\text{C}$.

Набор реагентов хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит!

Набор реагентов транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения в соответствии СП 3.3.2.2329-08 "Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов" Изменения и дополнения № 1 к СП 3.3.2.1248-03

Набор реагентов транспортируемый с нарушением температурного режима, применению не подлежит!

Срок годности набора реагентов: Бруцеллагара – 2 года, СД 1 и СД 2 – не менее срока годности среды. Набор реагентов с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит. После вскрытия банки с Бруцеллагаром гарантируется соответствие требуемым параметрам при соблюдении условий хранения (влажность, температура, герметичность) до окончания срока годности. Растворы СД 1 и СД 2 использовать в день приготовления.

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

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллёза сухой (Бруцеллагар)» по ТУ 9398-170-78095326-2012 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./факс (4967) 36-00-10, (4967) 36-01-16.

Зам. директора
по качеству и развитию



М.В.Храмов

Пронумеровано, прошнуровано,
скреплено подписью и печатью

6 (шесть)

листов. Подпись

" 21 " мая

20 2021

