

Директор ФБУН «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и
биотехнологии»

2016 г.



**по применению набора реагентов для бактериологических исследований
«Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных
менингитов, сухая» (ГБМ-агар)**

Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая» (ГБМ-агар) предназначен для бактериологических исследований в клинической микробиологии при анализе клинического материала от больных с подозрением на бактериальный менингит и с другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, а также при работе с чистыми культурами *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

ГБМ-агар предназначен для использования врачами-бактериологами, эпидемиологами и другими специалистами в области бактериологии.

ГБМ-агар состоит из сухой основы питательной среды (далее – Основа) – 1 банка и ростовой добавки (далее – РД) – 5 флаконов.

Основа представляет собой мелкодисперсный порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. Основу получают смешиванием сухих компонентов.

РД представляет собой пористую массу розового цвета, которую получают путём лиофильного высушивания раствора компонентов. Допускается неоднородная окраска РД.

3.ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает выделение и рост основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов и других требовательных микроорганизмов. В состав Основы ГБМ-агара входит стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ). СРГМ представляет собой мелко-дисперсный порошок, полученный путём ферментативного гидролиза суспензии чёрного альбумина с последующей сушкой методом распыления. Чёрный альбумин представляет собой либо высушенную дефибринированную кровь, либо высушенную массу форменных элементов крови, включая эритроциты, отделенную от сыворотки (плазмы) крови отстаиванием или сепарированием. В процессе сушки чёрного альбумина под воздействием повышенной температуры происходит разрушение эритроцитов. В связи с этим СРГМ имеет в своём составе термически лизированные эритроциты, а так же служит в питательной среде источником фактора X, необходимым для роста гемофильной палочки.

Другой фактор роста бактерий рода *Haemophilus* (V-фактор – никотинамидадениндинуклеотид), содержится в РД. Кроме того, РД включает ряд веществ, стимулирующих рост пневмококков и менингококков.

Исследуемый при диагностике бактериальных менингитов клинический материал (ликвор, кровь) в норме стерилен, поэтому любой выделенный из него микроорганизм может быть этиологическим агентом заболевания. Если использовать питательные среды, содержащие антибактериальные препараты в процессе исследования крови или спинно-мозговой жидкости, то возникает вероятность получения ложно-отрицательных результатов. ГБМ-агар не содержит ингибиторов роста микроорганизмов.

4.СОСТАВ

Состав Основы на 1 л питательной среды:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	12,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Пептон мясной	5,0 г
Глюкоза	1,0
Натрий хлористый	1,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещённый, безводный	0,5 г
Агар микробиологический	(12,0±2,0) ¹ г

¹ Варьирование величины связано с различной прочностью агарового геля

Состав РД, мг/л среды:

Цистеина гидрохлорид	250,0
L-глутамин	100,0
Аденин	10,0
Никотинамидадениндинуклеотид	1,5
Цианокобаламин	1,0
Тиамина пиррофосфат	1,0

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

5.1. Специфическая активность (чувствительность среды, скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов).

Питательная среда, приготовленная по п. 9.1 настоящей инструкции, через 18-24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере 5-10 % CO_2 обеспечивает рост следующих контрольных тест-штаммов:

H. influenzae ATCC 49247 - в виде серых слизистых, блестящих колоний диаметром 1,0-2,0 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} ;

N. meningitidis ATCC 13102 - в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний диаметром 1,0-2,0 мм с идеально ровными краями при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} через;

S. pneumoniae ATCC 6305 - в виде мелких полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний диаметром 0,4-0,6 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-5} . В зоне роста культуры должно наблюдаться обесцвечивание питательной среды.

5.2. Результаты клинических испытаний.

При исследовании 72 образцов носоглоточной слизи для бактериологического выявления назофарингеального носительства в ходе проведения клинических испытаний ГБМ-агара при доверительной вероятности 90%, выделены возбудители (*H. influenzae* тип b, *N. meningitidis* тип A, *S. pneumoniae*) в 19 образцах, выявляемость положительных проб составила $95\% \pm 2\%$ как на ГБМ-агаре, так и на контрольной среде – Шоколадный агар.

При проведении лабораторных исследований по выделению возбудителей гнойных бактериальных менингитов на ГБМ-агаре с использованием модели клинического материала (сыворотки крови) в 23 образцах, искусственно загрязнённых чистыми культурами тест-штаммов, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk», было получено 23 положительных результата, ложно отрицательных ответов не было.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2 Б (Приказ МЗРФ №4н от 06.06.2012 г).

При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Не использовать компоненты ГБМ-агара по истечении срока годности. Не использовать при нарушении целостности флаконов с РД во время транспортировки или хранения!

Неиспользованные компоненты набора с истёкшим сроком годности утилизируются любым методом, предотвращающим повторное использование по назначению.

Исследования с помощью ГБМ-агара проводить только в условиях специализированных бактериологических лабораторий медицинскими специалистами, имеющими разрешение на работу с микроорганизмами III-IV группы патогенности.

7. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- весы лабораторные 2 класса точности
- автоклав;
- чашки Петри;
- пипетки стеклянные или механические, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5 мл;
- вода дистиллированная, стерильная;
- колбы стеклянные, объёмом не менее 1 л
- термостат, обеспечивающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- оборудование и материалы для поддержания атмосферы с содержанием 5-10% CO_2 (анаэроостат с газогенерирующим пакетом, «свечной» сосуд с парафиновой свечой или CO_2 -инкубатор)

8. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Основным биологическим материалом для исследования при бактериальных менингитах служит спинномозговая жидкость и кровь. Для бактериологического выявления назофарингеального носительства исследуют носоглоточную слизь. При выявлении назофарингеального носительства рекомендуем использовать селективные добавки (СД-Г, СД-П и СД-М; см. п. 9.4) в соответствии с Методическими

рекомендациями МР 4.2.0078/1-13 от 21 октября 2013 г «Использование питательных сред для диагностики бактериальных менингитов».

Питательную среду можно использовать также при работе с чистыми культурами *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* и другими требовательными микроорганизмами.

9.ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

9.1. Подготовка к анализу

Приготовление питательной среды. Препарат Основы в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, нагревают до кипения, стерилизуют в автоклаве при температуре $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

В асептических условиях вскрывают флакон с РД и растворяют содержимое в 5,0 мл стерильной дистиллированной воды.

В охлаждённую до температуры $(45-55) ^\circ\text{C}$ Основу в асептических условиях вводят раствор РД из расчёта 5,0 мл на 1л Основы (1 флакон РД на 1 л Основы), разливают в стерильные чашки Петри, закрывают крышками и ставят для застывания при температуре $18-25 ^\circ\text{C}$.

Раствор РД не хранить, использовать немедленно после приготовления!

Готовая к применению питательная среда, разлитая в чашки Петри, прозрачная от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. Допускается наличие осадка от тёмно-коричневого до чёрного цвета. Готовую среду можно использовать в течение 7-10 дней при условии хранения её при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$.

9.2. Посев и инкубация.

Посев анализируемых образцов производят сразу же после их получения на предварительно прогретые в течение 10-15 мин в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ чашки со средами. Чашки с посевами инкубируют в перевёрнутом положении (крышкой вниз) в атмосфере 5-10 % CO_2 при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, время инкубации зависит от типа образца и целей исследования.

9.3. Учёт результатов.

Учёт результатов проводят визуально по наличию характерных колоний через 24-48 ч инкубации.

H. influenzae формирует серые слизистые блестящие колонии диаметром до 2 мм. Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического "мышинного" запаха.

N. meningitidis формирует полупрозрачные блестящие сероватого цвета колонии с идеально ровными краями диаметром до 2 мм,

S. pneumoniae формирует мелкие полупрозрачные чётко очерченные, не склонные к слиянию колонии, обесцвечивающие питательную среду в зоне роста.

9.4. При исследовании носоглоточной слизи рекомендуется использование селективного варианта ГБМ-агара. Для этого во время приготовления питательной среды одновременно с РД вносят селективную добавку. Селективные добавки в состав набора не входят. В соответствии МР 4.2.0078/1-13 от 21 октября 2013 г возможно самостоятельное приготовление и использование селективных добавок СД-Г, СД-П или СД-М, входящих в состав Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению» (Шоколадный агар, РУ № ФСР 2012/13081)

СД-Г предназначена для выделения *H. influenzae*. Благодаря природной устойчивости *H. influenzae* к бацитрацину, селективная добавка позволяет избирательно выделять гемофильную палочку из контаминированного материала, ингибируя рост широкого спектра микроорганизмов.

Состав СД-Г, мг/л среды:

Амфотерицин В	5,0
Бацитрацин	500,0
Ванкомицин	3,0

СД-П предназначена для выделения *S. pneumoniae*. Селективная добавка ингибирует рост грамотрицательных и не подавляет рост грамположительных микроорганизмов.

Состав СД-П, мг/л среды:

Амфотерицин В	5,0
Полимиксин В	10,0
Налидиксовая кислота	17,0

СД-М предназначена для выделения *N. meningitidis*. Селективная добавка подавляет рост широкого спектра как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, позволяя выделять менингококков из контаминированного материала.

Состав СД-М, мг/л среды:

Амфотерицин В	5,0
Полимиксин В	10,0
Ванкомицин	3,0

Все три селективные добавки подавляют рост *Candida albicans*.

10. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ.

Утилизация серий ГБМ-агара с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке производится по СанПиН 2.1.7.2790-10 как медицинские отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные отходы.

Уничтожение ГБМ-агара после работы с музейными штаммами и образцами клинического и другого инфицированного материала 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 $(126 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Обращение с медицинскими отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации, осуществляющей медицинскую и (или) фармацевтическую деятельность. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Набор реагентов транспортируют всеми видами крытого транспорта при соблюдении условий хранения.

Хранят в герметично закрытой упаковке в сухом защищённом от света месте. Основу хранят при температуре от 2°C до 25°C , а РД при температуре от 2 до 8°C . После вскрытия банку с Основой хранят до окончания срока годности плотно закрытой, в сухом месте, избегая попадания влаги.

РД после вскрытия не хранят, используют немедленно после приготовления!

Срок годности – 2 года.

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

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных

менингитов, сухая» (ГБМ-агар) в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. 8 (4967) 36-00-17.

Заместитель директора
по научно-производственной работе



А.П.Шепелин

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

_____ П.К. Варнавичус

« 13 »

2016 г



ПРОШЕНО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ
«13» 08 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

П.К. Вацнавичус _____

