

СОГЛАСОВАНО

Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь

«06» _____ 2019 г.
Б.Н. Андросюк



УТВЕРЖДАЮ

Управляющий

ООО «Научно-производственный центр

ХИММЕДСИНТЕЗ»

Апостол Н.А.

«06» _____ 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«Тест-система для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам»

ТУ ВУ 190612056.247–2014, изм. 1

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора
УП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

«06» _____ 2019 г.
Д.В. Гринько

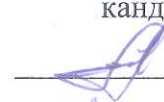


РАЗРАБОТЧИК

Заведующий лабораторией
внутрибольничных инфекций
НИЧ БГМУ

канд. мед. наук, доцент

«06» _____ 2019 г.
Г.А. Скороход



Разработана на основании «Метода определения устойчивости бактерий к дезинфектантам с использованием тест-системы». Инструкция по применению. Регистрационный № 020-1213. Утверждена заместителем Министра здравоохранения - Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь И.В. Гаевским 23.12.2013 г.;

Многочисленные исследования как в нашей стране, так и за рубежом свидетельствуют о том, что бактерии, особенно обитающие в больничных экосистемах, способны формировать устойчивость к используемым в практике дезинфекционным средствам и, следовательно, выживать и распространяться при их применении. Результатом этого является снижение эффективности дезинфекционных мероприятий, что является одним из факторов определяющим высокую частоту и повсеместное распространение ВБИ. В связи с этим Министерством здравоохранения Республики Беларусь принят ряд нормативных правовых актов, обязывающих учреждения здравоохранения периодически организовывать (не реже раз в квартал) определение чувствительности - устойчивости к дезинфектантам бактерий, выделенных из патологического материала от пациентов и объектов внешней среды.

Используемые на практике качественный и количественный суспензионный методы оценки эффективности дезинфектантов требуют значительных временных (выполняются в два этапа) и материальных (большой расход питательных сред и трудоёмкость) затрат. Микрометод определения устойчивости бактерий к дезинфектантам более чувствителен благодаря использованию редокс-индикатора, позволяет значительно снизить расход питательных сред и нейтрализатора, и выполняется в один этап – без посева исследуемых бактерий на плотные питательные среды.

Показания к применению

Метод, изложенный в настоящей инструкции по применению, предназначен для выявления устойчивых к дезинфицирующим средствам вариантов аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, формирующихся и циркулирующих в госпитальной среде. Метод может быть использован так же для определения уровня устойчивости бактерий к дезинфектантам и оценки эффективности дезинфектантов в отношении как типовых штаммов бактерий разных видов, так и госпитальных штаммов и экочаев бактерий.

Объект исследования

Изоляты аэробных и факультативно-анаэробных бактерий различных видов.

Описание технологии использования тест-систем для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам.

Приготовление бактериальной суспензии

Для приготовления бактериальной суспензии 18-20 часовые агаровые культуры микроорганизмов смывают стерильным 0,85% раствором хлорида натрия с добавлением 20,0% лошадиной сыворотки или 0,1% альбумина. Полученную бактериальную суспензию тщательно пипетируют, при наличии хлопьев, неравномерной взвеси перемешивают с помощью шейкера и стандартизируют тем же раствором до плотностью 1 млрд. 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 Ед ($1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл), набору стандартных образцов мутности ООО «Научно-производственный центр ХИММЕДСИНТЕЗ» или аналогичному стандарту Mc Farnland.

Приготовление растворов дезинфектантов.

Растворы дезинфектантов, начиная с рабочей концентрации, следует готовить с использованием стерильной водопроводной воды в объёмах 50-100 мл, что снижает погрешность в концентрациях препарата.

Описание тест-системы для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам

Тест-система представляет собой стерильную пластмассовую 96-луночную (объём лунок 0,2 мл) планшету разового пользования с крышкой и содержащимися в её лунках определёнными субстратами (рис.1, приложение 1).

Четыре вертикальных ряда лунок (1, 4, 7, 10) не содержат ингредиентов; четыре ряда (2, 5, 8, 11) содержат универсальный сложный нейтрализатор дезинфектантов, находящийся в высушенном состоянии и четыре ряда (3, 6, 9, 12) – высушенную питательную среду с индикатором. Цвет осадка в лунке с нейтрализатором – светло-жёлтый. Цвет осадка в лунках с питательной средой с индикатором – оранжевый. При растворении осадков растворы становятся светло-жёлтыми.

Перед работой с тест-системой необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией по применению, т.к. с помощью тест-системы возможна постановка опытов (выполнение работ) в различных вариантах и с различной целью.

К инструкции прилагается форма протокола исследования (приложение 2).

Комплектация набора:

1. пластиковая планшета с сухими субстратами в лунках в индивидуальной упаковке
2. инструкция по применению тест-системы

Дополнительные принадлежности, необходимые для работы:

1. микробиологические петли;
2. стерильные пробирки;
3. стерильные чашки Петри;
4. стандарт мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 Ед, набору стандартных образцов мутности ООО «Научно-производственный центр ХИМ-МЕДСИНТЕЗ» или аналогичный стандарт, Mc Farnland;
5. восьмиканальные микропипетки для работы в объёмах 50-100 мкл;
6. одноканальная микропипетка 5-50 мкл;
7. пластмассовые одноразовые наконечники к микропипеткам;
8. стерильная водопроводная вода;
9. стерильная дистиллированная вода;
10. 0,85% раствор хлорида натрия с 20,0% лошадиной сыворотки или 0,1% альбумина.

Требуемые условия и предосторожности:

1. Планшеты хранить при температуре $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$
2. Суспензию исследуемых микроорганизмов и растворы дезинфектантов необходимо готовить непосредственно перед использованием.
3. Для приготовления рабочих растворов использовать стерильную посуду.
4. Опасаться внешней контаминации микроорганизмами в процессе работы.

Проведение исследования:

1. Планшету (тест-систему) извлечь из упаковки.
2. Выполнить «разметку» тест-системы на крышке планшеты и протоколе исследования с учётом выбранного варианта постановки опыта. Один из вариантов разметки представлен на рис. 2 (приложение 1). Как видно на рис.2, используют секторный принцип разметки планшеты: шесть опытных секторов (I-VI) – вертикальные ряды лунок 1-9, и один общий контрольный (К) – ряды лунок 10-12.

Цифровые и буквенные обозначения по боковому и верхнему краю планшеты даны как система координат, позволяющая применять секторный принцип проведения исследований и учёта результатов.

В предлагаемом примере исследуют 2 штамма бактерий (*P. aeruginosa* и *E.coli*) по их чувствительности-устойчивости к трём дезинфектантам: X, Y, Z (рис.2).

В секторе контролей выполняется контроль роста обеих исследуемых культур (КК) и контроль питательной среды с индикатором (КС). КК₁ и КК₂ – контроль первой и второй культуры без экспонирования в нейтрализаторе, КН₁ и КН₂ – контроль первой и второй культуры, соответственно, после экспозиции в нейтрализаторе.

3. В ряды лунок планшеты с высушенными универсальным нейтрализатором (2, 5, 8, 11) (рис. 1, приложение 1) и питательной средой с индикатором (3, 6, 9, 12) 8-канальной пипеткой внести по 100,0 мкл стерильной дистиллированной воды и пипетировать содержимое лунок до полного растворения.

4. В ряды пустых лунок (1, 4, 7) внести по 100,0 мкл дезинфицирующих средств в рабочих концентрациях (наименьшая концентрация из рекомендованных инструкцией по применению препарата в качестве рабочей) и 1/2, 1/4 и 1/8 от неё; например (рис. 2 приложения 1), в лунки первого ряда А, В, С, D (сектор I) и Е, F, G, H (сектор II) внести дезинфектант X, лунки четвертого ряда А, В, С, D (сектор III) и Е, F, G, H (сектор IV) – Y, лунки седьмого ряда (сектор V, VI) – Z. Другие варианты постановки приведены в примечании.

5. В лунки с дезинфектантами (1, 4, 7 ряды) и пустые лунки 10-го ряда со 100,0 мкл водопроводной воды (контроли) внести по 20,0 мкл суспензии испытуемой бактериальной культуры (или бактериальных культур), стандартизированной(ых) до 1 млрд. взвеси.

6. После регламентированной инструкцией по применению каждого дезинфектанта экспозиции (рабочая экспозиция – минимальный промежуток времени, рекомендованный для экспозиции исследуемого дезинфектанта) микробной культуры в растворе препарата по 20,0 мкл из содержимого лунок 1, 4, 7 рядов перенести 8-канальной пипеткой в раствор нейтрализатора – лунки рядов 2, 5, 8, а также из части лунок контрольного сектора 10-ряда в ряд 11 (контроль роста исследуемых культур после экспонирования в нейтрализаторе – КН₁ и КН₂).

7. После 30-минутной экспозиции в нейтрализаторе всё содержимое лунок рядов 2, 5, 8 и контрольного 11-го (КН₁ и КН₂) перенести в лунки с питательной средой и тщательно перемешать многоканальным пипетированием.

8. В лунки контролем питательной среды с редокс-индикатором (КС) никаких дополнительных ингредиентов не вносят, в лунки с КК₁ и КК₂ вносят по 20,0 мкл исследуемых бактериальных культур.

Учёт и интерпретация результатов:

Осуществляется после инкубации тест-систем в термостате при 37°C в течение 18-24 часов, в зависимости от скорости роста бактериальной культуры в опыте и контроле. Наличие в питательной среде (ряды лунок 3, 6, 9, 12) редокс-индикатора позволяет зарегистрировать размножение бактерий по изменению цвета среды от исходного жёлтого до розового и ярко-розового.

Учёт и оценка контролей:

- а) контроль жизнеспособности испытуемой бактериальной культуры после экспозиции в нейтрализаторе (КН): изменение цвета питательной среды от жёлтого до розового или ярко-розового свидетельствует о росте и размножении исследуемых микроорганизмов;
- б) контроль питательной среды с индикатором: сохранение исходного цвета среды говорит о её стабильности в процессе хранения и инкубации тест-системы (отсутствии изменения Eh);
- в) контроль жизнеспособности испытуемой бактериальной культуры без экспонирования в нейтрализаторе.

1. При сохранении исходного жёлтого цвета в контроле среды и во всех лунках после воздействия препарата в рабочей концентрации и разведениях испытуемая культура оценивается как чувствительная, а дезинфектант – как эффективный.

2. При изменении цвета от жёлтого до розового или ярко-розового в контроле культуры КК и КН и во всех лунках с питательной средой после воздействия препарата в рабочей концентрации и разведениях испытуемая культура оценивается как устойчивая, а дезинфектант – как неэффективный.

3. При изменении цвета питательной среды в лунках после воздействия препарата в разведениях $\frac{1}{2}$ и/или $\frac{1}{4}$ от рабочей концентрации исследуемая бактериальная культура считается устойчивой к данной(ым) концентрации(ям). Данный штамм считают промежуточно устойчивым и относят к госпитальному экovarу.

ПРИМЕЧАНИЕ.

1. 96-луночную планшету (тест-систему) можно использовать при постановке опыта по выявлению устойчивых штаммов бактерий к дезинфектантам в различных вариантах:

- исследовать 1 штамм на чувствительность-устойчивость к 6 дезинфектантам;
- исследовать 6 штаммов на чувствительность-устойчивость к 1 дезинфектанту (контроли культур можно выполнять в других планшетах);
- исследовать 2 штамма на чувствительность-устойчивость к 3 дезинфектантам;
- исследовать 3 штамма на чувствительность-устойчивость к 2 дезинфектантам.

2. Тест-систему можно использовать для определения минимальной бактерицидной концентрации дезинфектантов в отношении бактерий разных видов, в т. ч. госпитальных экovarов. В этом случае, либо в ряду лунок выполняются разведения дезинфектантов от исходной рабочей концентрации (исходная $\rightarrow 1/2 \rightarrow 1/4 \rightarrow 1/8 \rightarrow 1/16$ и т.д.), либо эти разведения готовят вне планшеты и вносят в лунки 1, 4, 7 рядов тест-системы. В таком случае количество оцениваемых дезинфектантов в одной панели будет меньшим, чем при использовании рабочей и трех промежуточных концентраций препарата.

3. Выполняемый опыт оформляется в виде протокола, где представлен рисунок тест-системы с обозначением результатов («+» или «-»). В протоколе указываются:

- дата и время начала и окончания опыта,
- исследованные дезинфектанты в рабочих концентрациях и разведениях,
- время экспозиции препаратов,
- номера исследованных культур,
- результаты исследования,
- заключение.

Утилизация использованных тест-систем – путём автоклавирования при $(126 \pm 2)^\circ\text{C}$ (1,5 Мпа).

Возможные ошибки

1. Малая посевная доза испытуемой культуры бактерий (меньше $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл) может привести к ложноотрицательному результату исследования.
2. Использование недостаточно очищенной культуры бактерий (смесь видов или вариантов) может привести к ложной интерпретации полученных результатов.

3. Хранение тест-систем выше нормативного срока или при температуре выше нормативной может привести к дезактивации индикатора и нейтрализатора и получению неправильных результатов.

Хранение и срок годности

1. Хранение тест-систем должно производиться при температуре от плюс 2°C до плюс 6°C, в холодильнике в упаковке изготовителя на протяжении всего срока годности. При хранении избегать повреждающих упаковку воздействий.

2. Срок годности набора – 24 месяца.

Приложение 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Рисунок 1. Исходная планшета (тест-система). Условные обозначения:

- пустые лунки (для рабочей концентрации и разведений дезинфектантов)
- лунки с сухим нейтрализатором дезинфектантов
- лунки с сухой питательной средой и индикатором

	X			Y			Z					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Р		—	Р			Р					КС
B	$\frac{1}{2}$		—	$\frac{1}{2}$			$\frac{1}{2}$					
C	$\frac{1}{4}$		+	$\frac{1}{4}$			$\frac{1}{4}$					КК ₁
D	$\frac{1}{8}$		+	$\frac{1}{8}$			$\frac{1}{8}$					КК ₁
E	Р		—	Р			Р					
F	$\frac{1}{2}$		—	$\frac{1}{2}$			$\frac{1}{2}$					
G	$\frac{1}{4}$		—	$\frac{1}{4}$			$\frac{1}{4}$					КК ₂
H	$\frac{1}{8}$		—	$\frac{1}{8}$			$\frac{1}{8}$					КК ₂

Рисунок 2. Планшета с одним из вариантов разметки. Условные обозначения:

- Секторы I–VI - опытные, сектор К – контрольный;
- КК₁ – контроль культуры 1; КК₂ – контроль культуры 2; КС – контроль среды;
- Р, 1/2, 1/4, 1/8 – рабочая концентрация и разведения дезинфектантов.

Приложение 2

ПРОТОКОЛ
определения устойчивости бактерий к дезинфектантам
 № _____

Начало исследования _____

Окончание исследования _____

Штаммы бактерий: _____

Дезинфектанты (препарат, рабочая концентрация, рабочая экспозиция):

Исследуемые концентрации: _____

Заключение: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
B	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
C	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
D	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
E	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
F	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
G	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
H	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Исследование проводил _____