

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ-УСТОЙЧИВОСТИ
БАКТЕРИЙ-ОПОРТУНИСТОВ К АНТИСЕПТИЧЕСКИМ
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ, ПРИМЕНЯЕМЫМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
МЕСТНЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н. доцент Скороход Г.А., к.м.н., доцент Гудкова Е.И., к.б.н.Циркунова Ж.Ф., Буткевич В.В., Слабко И.Н., к.м.н. доцент Канашкова Т.А., к.м.н. Чистый А.Г., Бердник Н.Н.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – Инструкция) изложены методы оценки чувствительности-устойчивости бактерий-оппортунистов к антисептическим лекарственным средствам, применяемым для лечения местных гнойно-воспалительных заболеваний, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний и патологических состояний, вызванных бактериями-оппортунистами, а также контроль за циркуляцией в госпитальной среде устойчивых вариантов бактерий.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с местными гнойно-воспалительными процессами в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания, и (или) организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Методы, изложенные в инструкции, предназначены для оценки чувствительности-устойчивости бактерий-оппортунистов к антисептическим лекарственным средствам, применяемым для лечения местных гнойно-воспалительных заболеваний.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

Оборудование и лабораторная посуда:

- паровой стерилизатор (автоклав);
- дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды ГОСТ 6709-72;
- облучатель бактерицидный,
- шкаф ламинарный (бокс биологической защиты);
- холодильник с температурой в камере от +4°C до +8°C,
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру 35±2°C;
- рН-метр, диапазон рН от 1 до 14, точность 0,01 рН;
- весы аналитические с точностью 0,01-0,1 мг;
- вортекс-шейкер для микропробирок;
- автоматические дозаторы переменного объема 5-10 мл, 2-20 мкл; 100-1000мкл.
- стерильные чашки Петри, диаметр 90-100 мм;
- пробирки;
- штатив для пробирок;
- мерный цилиндр объемом 50 мл; 100 мл; 1л;
- микробиологические петли;
- горелка
- планшеты полимерные, 96-луночные, П-образные, стерильные, однократного применения;

- планшеты культуральные, полимерные, 24-луночные стерильные однократного применения;
- денситометр DEN – 1В или аналог;

Питательные среды, эталонные штаммы, реактивы и расходные материалы:

- Эталонные штаммы: *S. aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 11229;
- Хлоргексидин биглюконат (Белмедпрепараты, РБ);
- Бетадин (повидон йод 10%)(ЭГИС, Венгрия);
- триптиказо-соевый бульон;
- стерильный 0,85% раствор хлорида натрия;
- редокс-индикатор ТТХ (трифенилтетразолий хлорид);
- твин 80;
- сапонин;
- L-гистидин;
- лецитин;
- цистеин;
- пептон основной;
- этиловый спирт.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

1 ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП МЕТОДОВ

1. Приготовление питательной среды, нейтрализатора, инокулюма тест-культур

1.1 Приготовление питательной среды

Триптиказо-соевый бульон (ТСБ) готовят из стандартной сухой питательной среды: 30г сухой питательной среды растворяют в 1л дистиллированной воды, доводят до кипения, разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при 120° С в течение 15 минут.

1.2 Приготовление раствора индикатора

Индикатор ТТХ 2-3-5 (трифенилтетразолий хлорид).

0,4 г ТТХ растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды. Полученный 0,4% раствор, разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при 120° С в течение 10 минут.

1.3 Приготовление раствора универсального нейтрализатора антисептиков

Для нейтрализации антисептиков используют универсальный нейтрализатор, содержащий твин 80 (3%), сапонин (0,3%), гистидин (0,1%), лецитин (0,3%), цистеин (0,1%), пептон основной (1,0%). Раствор нейтрализатора доводят до рН 7,0±0,2 и стерилизуют паром при 1,1 атм. (121°С) 20 минут. Нейтрализатор хранят в холодильнике не более 14 суток.

1.4 Приготовление инокулюма

Для проведения исследования используют чистую культуру бактерий, выращенную в течение 18-24 часов на скошенном МПА при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$. Суспензии исследуемых тест-культур готовят смыванием физиологическим раствором с последующей стандартизацией по Мак Фарланд до $9,0 \times 10^8$ КОЕ\мл (McFarland Standard 3,0).

2. МЕТОД ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ-УСТОЙЧИВОСТИ ПЛАНКТОННЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ-ОПОРТУНИСТОВ К АНТИСЕПТИКАМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

При оценке чувствительности-устойчивости используют стандартные аптечные формы антисептиков, применяемые в клинической практике.

2.1. Подготовка 96-луночной планшеты

После извлечения планшеты из стерильной упаковки проводят ее разметку. На крышке планшеты в горизонтальных рядах лунок обозначают названия антисептиков и их пошаговые двойные разведения, вертикальных рядах – номера исследуемых клинических изолятов, эталонных штаммов (Рисунок 1).

2.2. Приготовление разведений антисептиков

Согласно разметке в первые обозначенные горизонтальные ряды для определенного антисептика вносят по 300,0 мкл его разведения, выполненного в ТСБ в соотношении 1/2, а в расположенные ниже ряды – по 150,0 мкл ТСБ. Затем, из лунок с исходными разведениями забирают по 150,0 мкл содержимого с последующим последовательным перенесением данного объема в нижние ряды лунок для получения разведений 1/4, 1/8, 1/16 и т.д. Из лунок с последним разведением часть содержимого, в объеме 150,0 мкл, удаляют.

2.3. Проведение исследования

В вертикальные ряды лунок с разведениями антисептиков вносят по 30,0 мкл стандартизованной суспензии тест-культур. Планшеты закрывают крышкой и помещают в термостат при 37°C на 18-24 часа.

После извлечения планшет из термостата во все лунки вносят по 30,0 мкл 0,4% раствора ТТХ с повторным помещением в термостат на 3-4 часа.

2.4. Учет результатов

Учет результатов производят по изменению цвета среды. Окрашивание среды в красный или бордовый цвет свидетельствует о жизнеспособности бактерий и, следовательно, устойчивости тест-культуры к данному разведению антисептика. То последнее разведение антисептика, при котором не происходит изменения цвета среды, является максимальным ингибирующим разведением (МИР) для исследуемой тест-культуры.

При исследовании средств, имеющих интенсивную окраску, например, бриллиантовый зеленый, фукоцин, вместо индикации роста культуры по изменению цвета ТТХ, необходимо использовать высев из лунок с разведениями антисептика на плотные питательные среды.

2.5. Определение бактерицидной активности антисептиков

После учета результатов определения МИР, при необходимости, можно установить наличие и степень максимального бактерицидного разведения (МБР). Для этого, в ряды лунок с неизменным цветом среды вносят по 50,0 мкл. универсального нейтрализатора. После перемешивания, содержимое лунок высевают по 20,0 мкл на чашки Петри с плотной питательной средой (МПА). Учет результатов проводят после суточной инкубации чашек при 37°C. Наличие роста в зоне посева свидетельствует о бактериостатической активности, отсутствие – о бактерицидной.

2.6. Контроли

2.6.1 Контроль культуры (КК), положительный контроль

В лунки с 150,0 мкл ТСБ вносят 30,0 мкл стандартизованной исследуемой тест-культуры, а затем 30,0 мкл 0,4% раствора ТТХ. Изменение цвета среды свидетельствует о жизнеспособности тест-культуры.

2.6.2 Контроль питательной среды (КС), отрицательный контроль

В лунки с 150,0 мкл ТСБ (без внесения тест-культуры), вносят 30,0 мкл 0,4% раствора ТТХ. Отсутствие изменения цвета свидетельствует об отсутствии контаминации среды.

2.6.3 Контроль достоверности полученных результатов

Для контроля результатов чувствительности-устойчивости используют значения МИР (Таблица 1), полученные на эталонных штаммах *S. aureus* и *E. coli*.

Таблица 1 - Контрольные значения МИР для планктонных культур

Антисептик	Значение МИР	
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
ХГ	64-128	64-128
Бетадин	8-16	4-8

При получении значений МИР, не выходящих за пределы контрольных, указанных в таблице, можно выполнять учет результатов

2.7. Показатели чувствительности-устойчивости бактерий:

МИР (максимальное ингибирующее разведение). МИР соответствует максимальному разведению антисептика от его рабочей концентрации при котором отмечается ингибирование роста исследуемой культуры;

МБР (максимальное биоцидное разведение). МБР соответствует максимальному разведению антисептика от его рабочей концентрации, при котором отмечается полная гибель исследуемой культуры;

МИР₁₀₀ (максимальное ингибирующее разведение) при котором отмечается ингибирование роста всех тест-культур определенного вида.

Чем больше величины МИР и МБР, тем активнее при прочих равных условиях антисептическое средство или чувствительнее культура.

3. МЕТОД ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ-УСТОЙЧИВОСТИ БИОПЛЕНОЧНЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ-ОПОРТУНИСТОВ К АНТИСЕПТИКАМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

3.1. Подготовка 24-луночной планшеты

После извлечения планшеты из стерильной упаковки выполняют её разметку. На крышке планшеты в горизонтальных рядах обозначают названия антисептиков и степень их разведения, в вертикальных - исследуемые клинические изоляты бактерий, эталонные штаммы (рисунок 2).

3.2. Формирование биопленочных культур бактерий

Для формирования биопленок бактерий во все ряды лунки планшеты вносят по 700,0 мкл ТСБ с последующим добавлением согласно разметке по 70,0 мкл стандартизованных по Мак Фарланд до $9,0 \times 10^8$ КОЕ/мл (McFarland Standard 3,0) 24 часовых исследуемых тест-культур бактерий. Планшеты закрывают крышкой и на двое суток помещают в термостат при 37°C для формирования бактериальных биопленок.

3.3. Приготовление разведений антисептиков

Используют стандартные аптечные формы антисептиков, применяемые в клинической практике. Разведения антисептиков готовят вне планшет после формирования биопленочных культур на момент их внесения, на ТСБ, в объемном соотношении, начиная с разведения 1/2.

3.4. Проведение исследований

Спустя двое суток инкубации планшеты извлекают из термостата. Из всех лунок, автоматической пипеткой, с обязательной сменой наконечников для каждой тест-культуры, удаляют надосадочную среду. Визуально убеждаются в формировании микробных биопленок на дне лунок. После чего, согласно протоколу исследования и разметке планшеты в лунки вносят по 1000,0 мкл разведений определенного антисептика. Планшету повторно помещают в термостат на одни сутки.

После извлечения планшет из термостата, из лунок, с обязательной сменой наконечников для каждой, аспирируют антисептик с последующим внесением в них по 1000,0 мкл ТСБ. Планшеты на 2-3 часа помещают в термостат. После извлечения из термостата во все лунки вносят по 50,0 мкл 0,4% ТТХ, планшеты помещают в термостат на 2-3 часа.

3.5. Учет результатов

Учет результатов производят по изменению цвета среды. Окрашивание среды в красный или бордовый цвет свидетельствует о жизнеспособности бактерий и, следовательно, неэффективности антисептика в данном разведении. То последнее разведение антисептика, при котором не происходит изменения цвета среды, является максимальным ингибирующим разведением (МИР) для исследуемой биопленочной тест-культуры.

При исследовании средств, имеющих интенсивную окраску, например, бриллиантовый зеленый, фукоцин, вместо индикации роста культуры по

изменению цвета ТТХ, необходимо использовать высев из лунок с разведениями антисептика на плотные питательные среды.

3.6. Определение бактерицидной активности

При определении бактерицидной активности антисептиков, т.е. максимального бактерицидного разведения (МБР), в ряды лунок с исходным цветом среды вносят по 500,0 мкл универсального нейтрализатора, и после перемешивания, из содержимого лунок по 20,0 мкл высевают на плотные питательные среды. Учет результатов проводят после суточной инкубации чашек при 37°C. Наличие роста в зоне посева свидетельствует о бактериостатической активности, отсутствие – о бактерицидной.

3.7. Контроли

3.7.1. Контроль биопленочной культуры (КК), положительный контроль

В лунки с биопленочной культурой, вместо антисептика, вносят по 1000,0 мкл ТСБ с последующим внесением 50,0 мкл ТТХ. Изменение цвета среды свидетельствует о жизнеспособности биопленочной культуры.

3.7.2. Контроль чувствительности-устойчивости биопленочных культур бактерий

Для контроля результатов чувствительности-устойчивости используют значения МИР (Таблица 2), полученные на эталонных штаммах *S. aureus* и *E.coli*.

Таблица 2 - Контрольные значения МИР для биопленочных культур

Антисептик	Значение МИР	
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
ХГ	8-16	4-8
Бетадин	8	8

При получении значений МИР, не выходящих за пределы контрольных, указанных в таблице, можно выполнять учет результатов

Изоляты *S. aureus*

Антисептики		№1	№2	№3	...	контроли		
Хлоргексидин	32	●	●	●	●	●	●	КК1
	64	●	●	●	●	●	●	КК2
	128	●	●	●	●	●	●	
Мукосанин	32	●	●	●	●	●	●	КС
	64	●	●	●	●	●	●	
	128	●	●	●	●	●	●	
Бетадин	4	●	●	●	●	●	●	
	8	●	●	●	●	●	●	
	16	●	●	●	●	●	●	
Хиндиокс	2	●	●	●	●	●	●	
	4	●	●	●	●	●	●	
	8	●	●	●	●	●	●	

Рисунок 1. Пример разметки 96-луночной планшеты при оценке чувствительности устойчивости планктонной культуры.

Примечание:
 К1 – контроль культуры №1;
 К2 – контроль культуры №2;
 КС – контроль питательной среды.

Изоляты *S. aureus*

Антисептики	Изолят № 1			Изолят №2		
Хлоргесидин	2	4	8	2	4	8
Бетадин	4	8	16	4	8	16
Бр. зеленый	4	8	16	4	8	16
Мукосанин	2	4	8	2	4	8

Рисунок 2. Пример разметки 24-луночной планшеты при оценке чувствительности-устойчивости биопленочной культуры.