

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



С.В.Нечай

2024 г.

Регистрационный № 013-1223

**МЕТОД УСКОРЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ
МИКОБАКТЕРИЙ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: кандидат медицинских наук, доцент Г.А. Скороход, кандидат медицинских наук, доцент Е.И. Гудкова, кандидат биологических наук Ж.Ф. Циркунова, И.Н. Слабко, Н.Н. Бердник, В.А. Новик-Пармон, В.В. Буткевич.

Минск, 2024

Инструкция по применению «Метод ускоренного определения эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий».

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: кандидат медицинских наук, доцент Г.А. Скороход, кандидат медицинских наук, доцент Е.И. Гудкова, кандидат биологических наук Ж.Ф. Циркунова, И.Н. Слабко, Н.Н. Бердник, В.А. Новик-Пармон, В.В. Буткевич.

В настоящей инструкции представлен метод, в основе которого лежит определение эффективности дезинфицирующих средств в отношении микобактерий в количественном суспензионном методе с применением в качестве тест-культуры эталонного штамма *M. fortuitum* ATCC 6841, относящегося к категории быстрорастущих видов из числа нетуберкулезных микобактерий.

Основным достоинством предлагаемого метода является возможность оценки результатов спустя 4-5 суток, в то время как с применением общепринятого – спустя 3 недели.

Ожидается, что внедрение инструкции по применению в практику позволит оценивать эффективность дезинфекционных средств в отношении микобактерий при выполнении скрининговых исследований при разработке эффективных противотуберкулезных средств профилактического назначения, в том числе, при подборе режимов их применения.

В инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод ускоренного определения эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий, основанный на применении тест-культуры эталонного штамма *M. fortuitum* ATCC 6841, относящегося к категории быстрорастущих видов из числа нетуберкулезных микобактерий, и выполнении исследований в малых объемах питательных сред и реагентов в пластиковых планшетах.

Метод может быть использован для скрининговых исследований при оценке эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий, отработке режимов применения новых дезинфицирующих средств.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с туберкулезом и микобактериозами.

Показания к применению метода.

Скрининговые исследования при оценке эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий. Оценка эффективности дезинфицирующих средств, применяемых в лечебных учреждениях.

Противопоказания к применению метода: нет.

Перечень необходимых изделий медицинского назначения, расходных материалов, реактивов и др.

- бокс биологической безопасности 3 класса;
- термостат $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$;
- холодильник $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$;
- стандарт мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 Ед или аналогичный стандарт Mc Farland;
- вортекс;
- дозаторы одноканальные автоматические на 100-1000 мкл, 20-100 мкл;

- одноразовые наконечники до 250 мкл и до 1000 мкл для дозаторов;
- металлический шпатель;
- стерильные 24-луночные пластиковые планшеты;
- стерильные конусные центрифужные стеклянные толстостенные пробирки на 10-12мл.
- стерильные стеклянные бусы диаметром 2-3 мм;
- стерильные чашки Петри;
- стерильная водопроводная вода;
- стерильная дистиллированная вода;
- агаровая среда Middelbrook;
- бульон Middelbrook
- универсальный нейтрализатор дезинфектантов;
- стерильная фильтровальная бумага размером 11,5x7,5 см (по размеру основания планшеты);
- эталонный штамм *M.fortuitum* ATCC 6841
- трифенилтетразолий хлорид (ГТХ) 0,04%.

Технология осуществления метода

Этап 1

1.1. Подготовка планшеты с агаризованной средой Middelbrook.

1. Извлекают планшету из стерильной упаковки.
2. Во все лунки стерильной 24-луночной планшеты в асептических условиях вносят по 2,0 мл расплавленного и охлажденного до 60-65°C агара Middelbrook.

3. Поверхность основания планшеты с лунками накрывают стерильной фильтровальной бумагой, необходимой для впитывания образующегося конденсата.
4. Планшету закрывают крышкой и оставляют при комнатной температуре до полного застывания агара.
5. Помещают планшету в холодильник для активизации удаления влаги на 1 час.
6. Удаляют фильтровальную бумагу с конденсатом.
7. Планшету переворачивают вверх дном для дальнейшего хранения в холодильнике.
8. Перед выполнением исследования планшету извлекают из холодильника, открывают и подсушивают в термостате в течение 20-30 минут.

*1.2. Подготовка рабочей суспензии тест-культуры *M. fortuitum* ATCC 6841.*

1. Коническую центрифужную стеклянную пробирку заполняют стеклянными бусами на высоту пробирки 2-2,5см, вносят стерильную дистиллированную воду на высоту её заполнения бусами.
2. Рабочую суспензию тест-культуры микобактерий готовят из тест-штамма первого или второго пассажа, выращенного на плотной питательной среде Middelbrook agar.
3. Культуру микобактерий снимают стерильным металлическим шпателем и помещают в подготовленную пробирку с стеклянными бусами.
4. При внесении в пробирку микробной массы лопатку шпателя вращают в столбике бус, что позволяет эффективно снять бактериальную массу со шпателя.
5. Микробную массу (суспензию) интенсивно гомогенизируют на вортексе, исключая выброс в верхний отдел (под пробку).

6. После получения гомогената добавляют 3-4 мл дистиллированной воды и проводят последующую гомогенизацию на меньшей скорости.
7. Исходную суспензию оставляют на 5 минут для осаждения.
8. Надосадочную жидкость отбирают пипеткой, переносят в стерильную пробирку и стандартизируют по Mc Farland или по другому стандарту до 10^9 КОЕ/мл.

Этап 2.

Постановка опыта и контролей.

1. Подготавливают схему постановки опыта в планшете (см. рисунок 1).

Ниже приводится пример такой схемы.

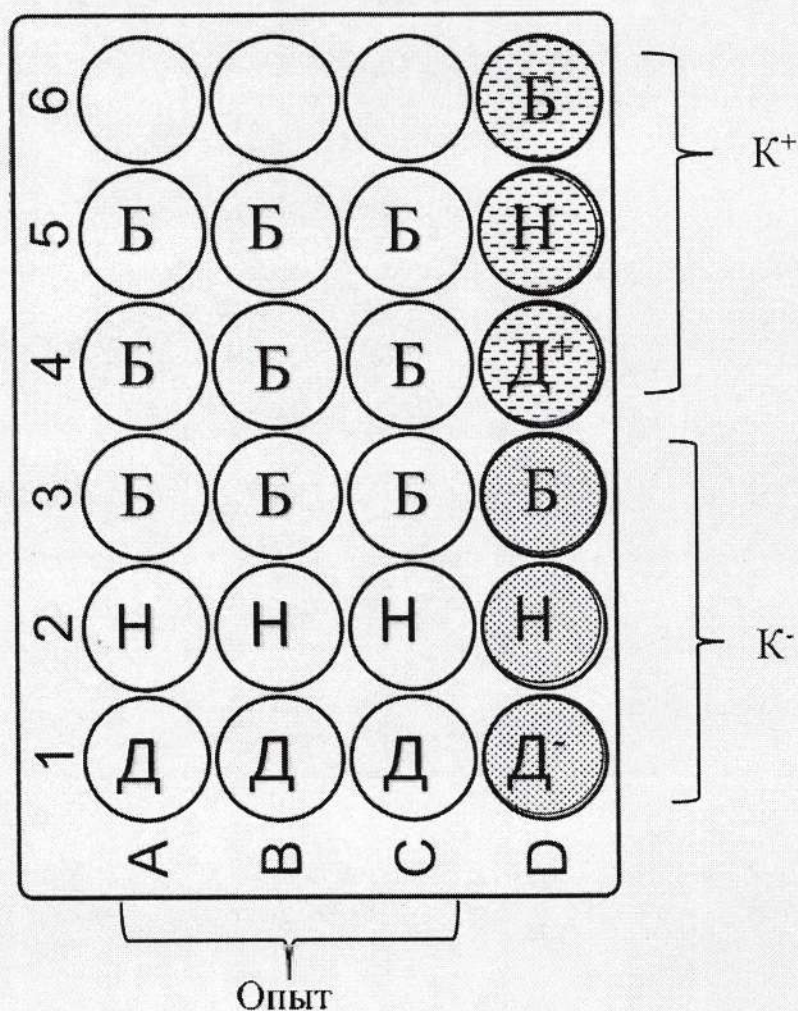


Рисунок. Схема постановки опыта в 24 луночном планшете

Условные обозначения: Д – дезинфектант, Н – нейтрализатор, Б – бульон, Д⁻ – дезинфектант (заведомо отрицательный контроль), Д⁺ – дезинфектант (заведомо положительный контроль)

2. Подготавливают стерильную 24-луночную планшету.
3. 3 нижние лунки (А, В, С) заполняют дезинфицирующим средством (Д) в объеме 0,9мл в испытуемых концентрациях, приготовленных на стерильной водопроводной воде.
4. В четвертую лунку нижнего ряда (D), вносят 0,9мл дезинфицирующего средства на основе ЧАС (отрицательный контроль). А в 4 лунку 4-го ряда вносят 0,9мл 6,0% H_2O_2 (положительный контроль).
5. Во все лунки второго ряда и в 4-ю лунку 5-го ряда вносят по 0,9мл нейтрализатора дезинфектантов. Все остальные лунки заполняют бульоном Middelbrook в объеме 0,9мл.
6. В лунки с разведениями дезинфектантов и в лунки с положительным и отрицательным контролями вносят по 0,1 мл рабочей суспензии тест-культуры с обязательной сменой наконечников пипет-дозатора, перемешивают круговыми движениями и пипетированием.
7. По истечении экспозиции в опыте и контролях, содержимое лунок тщательно перемешивают со сменой наконечников и в объеме 0,1мл переносят в лунки с нейтрализатором, с экспозицией в течение 5 минут. Из лунок с нейтрализатором переносят по 0,1мл в лунки 3, 4 и 5 рядов с бульоном (Б), с обязательным перемешиванием со сменой наконечников для каждой концентрации дезинфектанта.
8. Из лунок с отрицательным и положительным контролями по 0,1мл содержимого переносят в лунки с нейтрализатором, тщательно перемешивают. По окончании нейтрализации переносят по 0,1мл в лунку с бульоном.
9. После выполнения всех вышеописанных действий, из всех лунок с нейтрализатором и бульоном (опытных и контрольных) по 0,1мл содержимого высевают в лунки предварительно подготовленной планшеты с агаризованной средой Middelbrook.

10. Планшеты с посевами помещают в термостат крышкой вверх на 3-4 часа для впитывания суспензии, с последующим переворачиванием для инкубации в течение 4-5 суток при температуре 37°C.

11. По истечении инкубации во все лунки планшеты вносят по 0,05мл 0,04% раствора ТТХ.

12. Планшеты повторно помещают в термостат до появления окрашивания колоний в красно-розовый цвет, которое обычно происходит в течение 3-4 часов.

13. Для определения биологической концентрации тест-микроба в рабочей суспензии из суспензии делают 6 разведений с 10-кратным шагом до 10^3 микробных клеток в 1 мл. Производят посев 0,1мл суспензии из последнего разведения на 3 чашки с агаризованной средой Middelbrook.

14. Параллельно вышеописанным действиям выполняют постановку остальных контролей (см. таблицу 1).

Таблица – Учет и оценка контролей

№ пробы	Назначение операции исследования	Процедура выполнения операции исследования	Ожидаемый результат
1	Референс - контроль количества бактерий	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на дистиллированной воды + 1 мл дистиллированной воды	Примерно одинаковое количество колоний в посевах проб (по 0,1 мл) на плотной питательной среде
2	Контроль полноты нейтрализации ДС	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора ДС	
3	Контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора нейтрализатора	

Примечание: спустя 5 минут после постановки контролей, из каждой из трех проб производят посев смеси по 0,1 мл на чашки с питательной средой, которые инкубируют в термостате при 37°C в течение 5 суток, по истечении инкубации учитывают результаты исследований.

Этап 3.

Учет и интерпретация результатов.

1. Контроль суспензии: считают среднее количество колоний, выросших на плотной питательной среде. С учетом коэффициента разведения выполняют перерасчет количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии. Количество жизнеспособных клеток в рабочей суспензии должно быть не менее $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл.
2. Положительный контроль – отсутствие роста тест-культуры.
3. Отрицательный контроль – наличие роста тест-культуры.
4. Референс - контроль количества бактерий, контроль полноты нейтрализации дезинфицирующего средства, контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора – примерно одинаковое количество в посевах тест-культуры.
5. Учет результатов опыта.

Учет результатов в планшете с агаризованной средой Middelbrook выполняют после окрашивания колоний в красно-розовый цвет.

Например:

Первый вариант. Среднее число колоний в лунках 3,4,5 ряда А равно 5. Тогда КОЕ/мл составляет: $5,0 \times 10$ (фактор разведения) $\times 10^3 = 5,0 \times 10^4$ КОЕ/мл. (4,69lg)

Второй вариант. Рост единичных в посевах из нейтрализатора соответствует не более, чем 10^3 КОЕ/мл.

Подсчитывают количество выросших колоний на плотной питательной среде, делают перерасчет количества жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), учитывая коэффициент разведения. Определяют десятичные логарифмы и факторы редукции (RF) числа бактерий в опыте по сравнению с контролем,

дезинфицирующее средство считается эффективным, если фактор редукации (RF) больше 5.

Фактор редукации (RF) рассчитывают по формуле:

$$\log RF = \log (КОЕ K_0) - \log (КОЕ D),$$

где: КОЕ K_0 - количество КОЕ на мл без воздействия средства;

КОЕ D - количество КОЕ на мл после воздействия средства

Перечень возможных осложнений при применении метода: отсутствуют.

ОБОСНОВАНИЕ

целесообразности практического применения «Метода ускоренного определения эффективности дезинфицирующих средств в отношении микобактерий»

Профилактика туберкулеза остается весьма важной задачей в связи с ее особой экономической и клинической значимостью. Дополнительной проблемой является повышенная устойчивость микобактерий к воздействию многих химических веществ и факторов внешней среды. Выделяемые больными и бактерионосителями микобактерии туберкулеза могут сохранять жизнеспособность во внешней среде до нескольких лет. Контаминированные бактериовозбудителями объекты госпитальной среды нередко превращается в мощные, длительно циркулирующие резервуары туберкулезной инфекции [Н. И. Еремеева, с соавт. 2015].

Таким образом, в противотуберкулезном учреждении сотрудники, пациенты и посетители подвергаются риску заражения нозокомиальным туберкулезом. Особую остроту проблеме придает тот факт, что нозокомиальный туберкулез в противотуберкулезных учреждениях – это, по большей части, туберкулез с множественно резистентным возбудителем. Это объясняется тем, что пациенты, выделяющие мультирезистентные штаммы, находятся в стационаре дольше, чем пациенты с лекарственно-чувствительными микобактериями туберкулеза, и в течение длительного времени выделяют в окружающую среду микобактерии, которые при отсутствии эффективной дезинфекции могут длительно сохраняться на поверхности различных предметов [Н. И. Еремеева, с соавт. 2015].

Следовательно, в системе мер предупреждения распространения туберкулеза первостепенное значение имеют дезинфекционные мероприятия, направленные на разрыв пути передачи возбудителя из окружающей среды к восприимчивому макроорганизму.

Для предотвращения передачи микобактериальных патогенов медицинские изделия, оборудование и объекты госпитальной среды подлежат обработке дезинфицирующими средствами с доказанной микобактерицидной активностью, так как по устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам микобактерии превосходят многие микроорганизмы. В связи с этим для инактивации микобактерии во внутрибольничной среде применяются растворы ДС, должны обладать надежным туберкулоцидным действием.

Обычно, для оценки эффективности дезинфицирующих средств в отношении микобактерий в лабораторных условиях используется тест-культура *M.terrae*, так как данный вид не являясь патогенным, как *M.tuberculosis* и *M.bovis* обладают более высокой устойчивостью к дезинфектантам по сравнению с ними. Помимо этого, *M.terrae* растет несколько быстрее, чем патогенные микобактерии. Тем не менее, при оценке эффективности дезинфицирующих средств на тест-культуре *M.terrae* занимает не менее 3 недель [«Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности.» Руководство Р4.2.2643-10. Москва 201; Залуцкая О.М. с соавт. 2013].

Для ускорения процесса скрининга химических веществ на микобактерицидную активность необходим подбор модели (тест-культуры) из категории быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий, например, таких как *M.phlei*, *M.abscessus*, *M.fortuitum* и др. с целью разработки метода ускоренного определения эффективности дезинфицирующих средств в отношении микобактерий.

В связи с этим, возможность использования микобактерии быстрорастущего вида, не уступающей по устойчивости *M.terrae*, позволит минимизировать затраты труда и времени.

Литературные данные свидетельствуют, что в ряде случаев для оценки биоцидной активности дез. средств исследователи используют как медленно-, так и быстрорастущие виды микобактерий, сопоставляя полученные

результаты резистентности. Например, при определении видовой устойчивости НТМ 7 медленнорастущих видов (*M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.scrofulaceum*, *M.intracellulare*, *M.terrae*, *M.tiviale*, *M.xenopi*) и 6 быстрорастущих (*M.diernhoferi*, *M.flavescens*, *M.fortuitum*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.thamnopheos*) к хлорсодержащим средствам [А.П. Палий, 2014] показано, что 2 медленнорастущих вида (*M.intracellulare* и *M.scrofulaceum*) и 3 быстрорастущих (*M.diernhoferi*, *M.thamnopheus*, *M.fortuitum*), обладали не меньшей резистентностью чем *M.terrae*. Показано, что к одному и тому же дезинфектанту НТМ разных видов проявляли различную резистентность, однако наибольшая устойчивость была отмечена у культуры *M.fortuitum*.

Согласно полученным данным [Е.В. Тарасова, Е.П. Евлевская. 2014], возбудитель туберкулеза *M.avium* по степени резистентности к действию альдегидсодержащего кислотного и двух хлорсодержащих дезинфектантов существенно уступал тест-культуре *M.fortuitum*.

Представители комплекса *Mycobacterium abscessus* (быстрорастущий вид) обладали более высокой устойчивостью к ДС по сравнению с медленнорастущим - *M.avium* и *M.bovis* [Winona Burgess et al., 2017].

В исследованиях [Winona Burgess et al., 2017] отмечено, что в ряде случаев устойчивость быстрорастущих и медленнорастущих видов микобактерий в целом не отличалась.

Приведенные литературные данные свидетельствуют о неоднородной резистентности к дезинфектантам различных химических групп как среди быстро, так и среди медленнорастущих видов НТМ. В ряде случаев резистентность быстрорастущих НТМ превышала таковую у микобактерий патогенных видов и была не ниже резистентности тест-культуры *M.terrae*. Что является предпосылкой для возможности подбора и использования определенного медленнорастущего вида из числа НТМ для разработки метода ускоренного определения эффективности дезинфицирующих средств в отношении микобактерий.

Для ускорения процесса скрининга химических веществ на микобактерицидную активность проведен подбор тест-культуры из категории доступных эталонных штаммов быстрорастущих видов нетуберкулезных микобактерий.

Проведенная сравнительная оценка эффективности дезинфицирующих средств в отношении стандартной тест-культуры *M.terrae* и эталонного штамма быстрорастущего вида *M.fortuitum* свидетельствует об одинаковых, сравнимых результатах чувствительности этих штаммов к дезинфицирующим средствам (см. таблица 1) и, следовательно, о возможности применения *M.fortuitum* ATCC 6841 для ускоренной оценки эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий.

Таблица 1 – Результаты сравнительной оценки эффективности дезинфектантов в отношении тест-культур *M.terrae* ATCC 15755 и *M.fortuitum* ATCC 6841

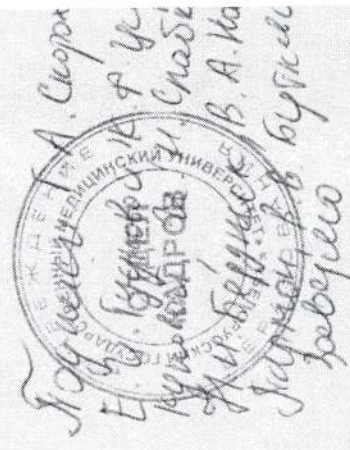
Тест-культура	Минимальная ингибирующая концентрация %														
	Ди-Хлор					Глутаровый альдегид					Дуасепт				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>M.terrae</i> ATCC 5755	0,019	0,009	0,009	0,009	0,009	0,62	0,62	0,31	0,62	0,62	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>M.fortuitum</i> ATCC 6841	0,019	0,009	0,009	0,009	0,009	0,31	0,62	0,31	0,62	0,62	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Таблица 2 – Результаты сравнительной оценки эффективности H_2O_2 (4,0%) в отношении тест-культур *M.terrae* ATCC 15755 и *M.fortuitum* ATCC 6841

Тест-культура	H_2O_2 (4,0%) Экспозиция (минуты)				
	1	2	3	4	5
<i>M.terrae</i> ATCC 5755	60	60	60	60	60
<i>M.fortuitum</i> ATCC 6841	60	60	60	60	60

Авторы:

- Г.А. Скороход
- Е.И. Гудкова
- Ж.Ф. Циркунова
- И.Н. Слабко
- Н.Н. Бердник
- В.А. Новик-Пармон
- В.В. Буткевич



Спец. по классам 1 категории

Киселева Ю.В.