

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Директор РНПЦ эпидемиологии
и микробиологии
канд. мед. наук, доцент

_____ В.А Горбунов
«_____» _____ 2013 г.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРО- И МАКРОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ И ИХ АКТИВНО ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Авторы: член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, д-р мед.наук, профессор Л.П. Титов, м.н.с. лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» И.А.Гаврилова

Минск, 2013

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) предназначена для оценки специфической активности дезинфицирующих средств на бактериальные клетки, а также для исследования признака чувствительности/устойчивости бактерий к дезинфицирующим средствам. Возможно исследование как типовых культур бактерий, так и бактерий выделенных из клинического материала и объектов внешней среды.

Предлагаемый метод основан на выявлении биологических маркеров повреждения бактерий под воздействием дезинфицирующих средств с помощью атомно-силовой микроскопии. Оцениваются как изменения морфологии бактериальных клеток под воздействием активно действующего вещества дезинфектанта (макромаркеры), так и изменения наномеханических свойств поверхностных образований бактерий (микромаркеры).

Инструкция предназначена для научных сотрудников, осуществляющих разработку и токсикологическую оценку дезинфицирующих средств, научных сотрудников испытательных лабораторий (центров) для оценки специфической активности дезинфицирующих средств, аккредитованных в этой области.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Оценка специфической (противобактериальной) активности дезинфицирующих средств.
2. Определение устойчивости бактерий к дезинфектантам.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Метод предлагается для работы с бактериями 3-ей и 4-ой группы патогенности

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ

1. Растворы дезинфицирующих средств и/или навески их активно действующих веществ
2. Плотные питательные среды, соответствующие потребностям тест-микробов
3. Стерильная водопроводная и дистиллированная вода
4. Стерильный физиологический раствор
5. Бактериологический стандарт мутности
6. Флаконы и биологические пробирки для приготовления рабочих растворов дезинфектантов
7. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки 1,5 мл)
8. Лабораторная посуда для культивирования бактерий: чашки Петри, пробирки
9. Бактериальные петли
10. Покровные стекла
11. Автоматические пипет-дозаторы с переменным объемом 200-1000 мкл и наконечники к ним
12. Весы
13. Термостат
14. Вортекс-шейкер для микропробирок
15. Микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф до 10 тыс. об/мин
16. Атомно-силовой микроскоп с пакетом прикладных программ обработки изображений

ОПИСАНИЕ ОБЪЕМА И ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА (см. Приложение А):

1. **Приготовление растворов дезинфицирующих средств**

1.1 Растворы дезинфектантов готовят с использованием стерильной водопроводной воды в макрообъемах, что снижает погрешность в концентрациях препарата.

1.2 Рабочая концентрация дезинфицирующего средства соответствует указанной в инструкции производителя. При необходимости оценки бактерицидной концентрации дезинфектанта и/или оценки влияния на бактерии суббиоцидных концентраций дезинфицирующих средств (ДС) готовятся двукратные разведения предполагаемой рабочей концентрации.

2. Подготовка тест-культуры бактерий к исследованию

2.1 Тест-культуру бактерий выращивают на плотной питательной среде при температуре 37°C в течение 18-24 часов.

2.2 Суточную культуру бактерий переносят с поверхности питательной среды в дистиллированную воду. Концентрацию бактерий в суспензии доводят по оптическому стандарту мутности до концентрации 2×10^9 КОЕ/мл.

2.3 Бактериальную суспензию разливают в микропробирки Эппендорфа по 1,0 мл для каждой пробы.

2.4 Взвесь бактерий центрифугируют (6000 об/мин, 15 мин), удаляют надосадочную жидкость.

3. Воздействие дезинфицирующих растворов на бактерии

3.1 Подготовленные бактериальные клетки опытных образцов ресуспензируют в 1,0 мл исследуемых концентраций ДС, тщательно пипетируют и встряхивают на шейкере.

3.2 В качестве контроля выступает образец бактерий, не подвергшийся воздействию ДС. Контрольный образец ресуспензируют в 1,0 мл стерильной водопроводной воды.

3.3 За две минуты до истечения экспозиции ДС пробирки со взвесью бактерий в дезинфектанте и контрольный образец помещают в центрифугу и центрифугируют в течение 2 минут при 8000 об/мин.

3.4 Надосадочную жидкость немедленно удаляют, осадок из бактерий заливают 1,0 мл дистиллированной воды, пипетируют и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 2 мин. Затем дважды отмывают бактерии физиологическим раствором, осаждая клетки центрифугированием (6000 об/мин, 15 мин) и удаляя солевой раствор. Завершают отмывку бактерий от молекул дезинфектанта центрифугированием в стерильной дистиллированной воде (6000 об/мин, 5 мин).

3.5 Бактерии контрольного образца после удаления стерильной водопроводной воды по завершении экспозиции отмывают тем же способом одновременно с опытными образцами.

4. Приготовление бактерий к исследованию с помощью атомно-силовой микроскопии

4.1 Отмытые бактериальные клетки вновь суспензируют в 1,0 мл стерильной дистиллированной воды, выравнивают оптическую плотность бактериальной взвеси, доводя её до 10^9 КОЕ/мл по стандарту мутности.

4.2 Каплю полученной суспензии наносят на поверхность покровного стекла размером 5x5 мм, которое используется в качестве подложки образца бактерий при проведении атомно-силовой микроскопии.

4.3 Выдерживают в закрытых чашках Петри при комнатной температуре в течение 60 минут, не допуская высыхания, для адгезии бактерий на поверхности стекла.

4.4 Затем подложку с осажденными бактериями деликатно промывают дистиллированной водой, высушивают в асептических условиях на воздухе.

4.5 Готовые образцы исследуют в ближайшие сутки для предотвращения изменений поверхностных образований и морфологии бактерий под воздействием факторов окружающей среды.

5. Атомно-силовая микроскопия образцов бактерий

5.1 Приготовленные образцы бактерий исследуются методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в контактном режиме на воздухе. Используются контактные кантилеверы CSC38 (константы жесткости 0,36 Н/м).

5.2 Анализ и обработка изображений проводятся с использованием функций Particle analysis, Section analysis, Roughness специализированной прикладной программы обработки АСМ-изображений.

5.3 Оценивают морфологические параметры клеток бактерий (длину, ширину, высоту) на АСМ-сканах с размером не более 10x10 мкм. Измерение морфопараметрических характеристик оптимально проводить с использованием функции Section analysis (с построением продольных и поперечных профилей сечений бактерий).

5.4 Оценивают физические свойства структур поверхности (шероховатость и визуально оценивают структурированность поверхности бактерий) при воздействии дезинфектанта. Шероховатость измеряют с использованием функции Roughness на минимум двух участках поверхности площадью максимум 1x1 мкм для каждой бактериальной клетки.

6. Оценка результатов

6.1 Выявляют биологические макромаркеры гибели клеток бактерий

6.2 Оценивают изменения морфологических параметров бактериальных клеток в контрольном и опытных образцах.

6.3 Оценивают изменение шероховатости поверхности бактерий под действием химического вещества ДС

Объективные критерии утраты жизнеспособности бактериальными клетками под действием активно действующего вещества дезинфицирующего средства:

А) Биологические макромаркеры повреждающего действия дезинфектантов:

1. выход клеточного содержимого и, как следствие, гибель бактериальных клеток и образование «теней» бактерий бактерий;

Б) Биологические микромаркеры

1. увеличение продольных и/или поперечных размеров бактериальных клеток на 35% и более в опытных образцах по сравнению с контрольным образцом;

2. снижение высоты бактериальных клеток на 50% и более в опытных образцах по сравнению с контрольным образцом;

3. выраженная структурированность поверхности бактерий, которая выражается в достоверном более чем двукратном увеличении шероховатости поверхностных образований бактерии.

При наличии признака-макромаркера и/или совокупности двух и более микромаркерных повреждений бактериальных клеток под воздействием дезинфектанта делают заключение об эффективности исследуемого дезинфицирующего средства в данной концентрации в отношении тест-бактерии (при исследовании эффективности антибактериальной активности дезинфицирующих препаратов) и/или о чувствительности тест-бактерии к исследуемому дезинфицирующему средству в данной концентрации (при оценке чувствительности/устойчивости бактерий).

Преимущества предлагаемого метода:

1. Позволяет визуально оценить изменения бактерий как на уровне всей популяции, так и на уровне отдельных бактериальных клеток под воздействием дезинфицирующих средств в различных концентрациях, что обуславливает новизну предлагаемого метода;

2. Позволяет выявить объективные критерии действия дезинфектанта, позволяющие судить об утрате жизнеспособности бактерий и отсутствии формирования состояния «некультивируемые, но жизнеспособные бактерии»;

3. Может быть использован как для исследования эффективности антибактериальной активности дезинфицирующих препаратов, так и для оценки чувствительности/устойчивости бактерий к дезинфицирующим средствам;

4. Позволяет установить рабочую и сублетальные концентрации дезинфектантов;

5. Данные, полученные при атомно-силовой микроскопии бактерий после воздействия сублетальных концентраций дезинфектантов, могут быть использованы для выявления особенностей устойчивых и чувствительных к дезинфицирующим средствам бактериальных клеток и установления механизмов адаптации бактерий;

6. Применение методов вариационной статистики при обработке полученных данных позволяет подтвердить достоверность результатов исследования.

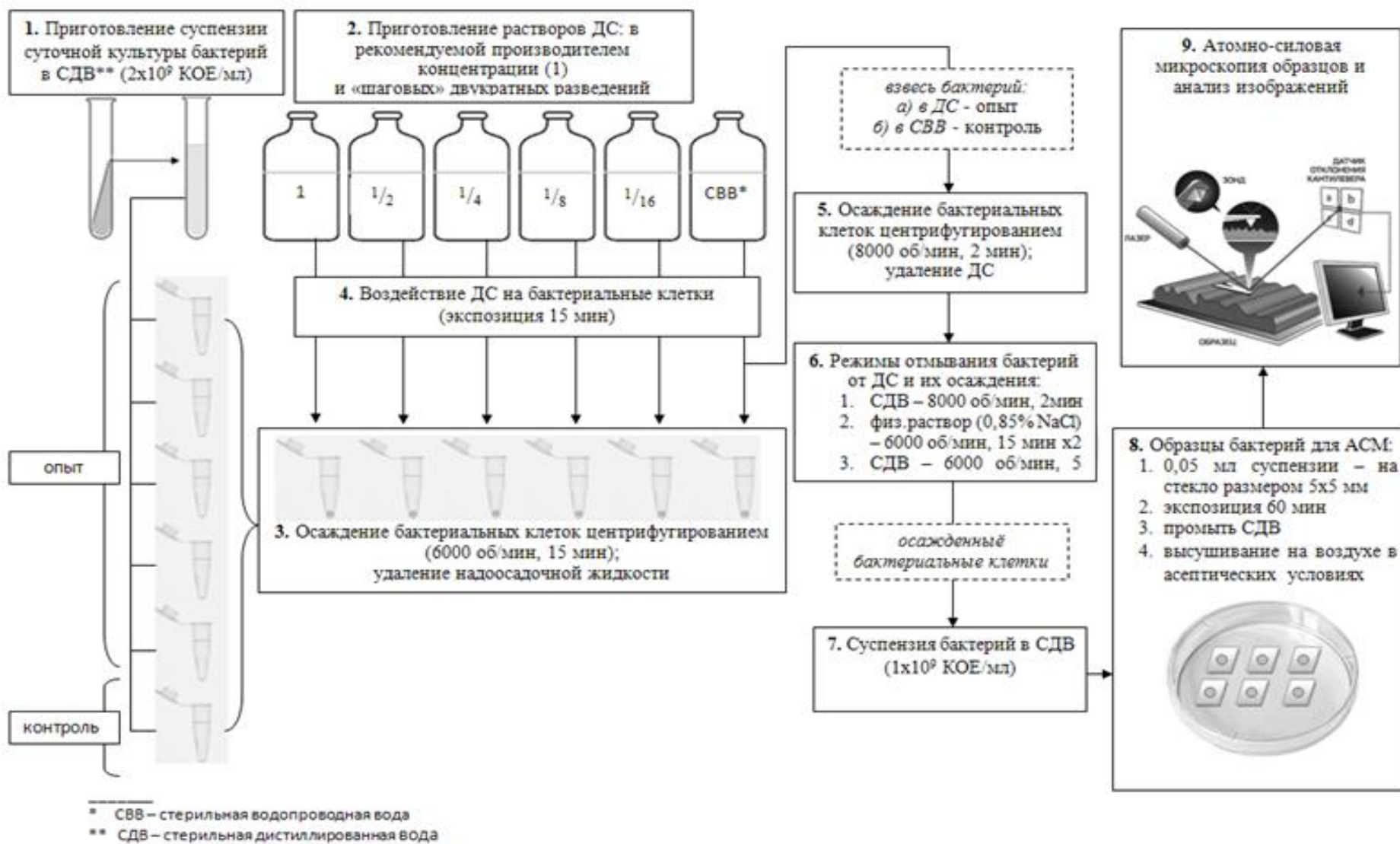
Возможные ошибки и пути их преодоления

1. В зависимости от видовой принадлежности бактерий и морфологических характеристик конкретного штамма, может потребоваться модификация подготовки образцов бактерий к исследованию с помощью атомно-силовой микроскопии. Для увеличения количества адгезируемых клеток бактерий на подложках образцов рекомендуется увеличить время адгезии и не рекомендуется использовать растворы полиэлектролитов для модификации подложки образца с целью предотвращения осаждения на подложке остаточных молекул дезинфектанта.

2. В зависимости от активно действующего вещества дезинфицирующего средства может потребоваться дополнительный цикл отмывки дезинфектанта (физиологический раствор-осаждение клеток-отмывка стерильной дистиллированной водой).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Рисунок А.1 – Схема постановки опыта по воздействию биоцида на бактерии и подготовка клеток к исследованию с помощью АСМ



Проект Инструкции на метод №295 (утверждён на заседании Ученого совета Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» №12 от 02.12.2013