

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л.Пиневиц
2018г.
Регистрационный № 230-1218



**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ
ГРИБОВ К АНТИСЕПТИКАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.б.н. Циркунова Ж.Ф., к.м.н., доцент Скороход Г.А., к.м.н., доцент Гудкова Е.И., Слабко И.Н.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – Инструкция) изложены методы оценки устойчивости грибов к антимикробным средствам (антисептикам и дезинфектантам), применяемым в клинической практике.

Методы позволяют определить спектр и уровни устойчивости патогенных грибов к дезинфектантам и антисептикам, что обеспечивает обоснованный выбор и применение средств местного противомикробного лечения и неспецифической профилактики микозов, контроль за циркуляцией в госпитальной среде устойчивых вариантов грибов.

Настоящая инструкция предназначена для клинических бактериологических лабораторий, лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, осуществляющих государственный надзор за эпидемиологическим режимом лечебно-профилактических учреждений.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод, изложенный в инструкции, предназначен для исследования устойчивости к антисептикам и дезинфектантам клинически значимых дрожжевых грибов (*Candida spp.* и *Cryptococcus spp.*).

ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа в испытательной лаборатории должна проводиться в соответствии с системой обеспечения качества, предусматривающей контроль питательных сред и реактивов, контроль исправности измерительных приборов и методов стерилизации и условий инкубации.

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;
- стерильные чашки Петри, диаметр 90-100 мм;
- планшет стерильный, 96-луночный плоскодонный с крышкой, культуральный;
- пробирки;
- штатив для пробирок;

- мерный цилиндр объемом 50 мл;
- микробиологические петли;
- горелка
- планшеты полимерные, 96-луночные стерильные однократного применения;
- денситометр DEN – 1В;

Питательные среды, реактивы и расходные материалы:

- декстрозный агар Сабуро;
- декстрозный бульон Сабуро;
- стерильный 0,85% раствор хлорида натрия;
- твин 80;
- сапонин;
- L-гистидин;
- лецитин;
- цистеин;
- пептон основной;
- этиловый спирт.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДОВ

1. Приготовление питательных сред, нейтрализатора

1.1 Приготовление питательных сред

Сабуро агар и Сабуро бульон готовятся из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя, автоклавируются 10 мин при 115°C.

Качество питательных сред является одним из важнейших факторов, влияющих на достоверность результата анализа. Поэтому контроль качества питательных сред должен осуществляться на всех этапах технологического процесса, начиная от момента закупки среды до непосредственного использования в анализе. Требования к контролю качества питательных изложены в инструкции «Хранение, приготовление и контроль качества питательных сред». Инструкция по применению рег. № 079-0210, утв. Постановление Минздрава РБ от 19.03.2010.

1.2 Приготовление нейтрализатора

Для нейтрализации действия антисептиков и дезинфектантов используют универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3%), гистидин (0,1%), лецитин (0,3%), цистеин (0,1%), пептон основной (1,0%). Если в состав средства входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия (0,1—1,0%). Раствор нейтрализатора доводят до pH 7,0±0,2 и стерилизуют паром при 1,1 атм. (121°C) 20 минут. Нейтрализатор хранят в холодильнике не более 14 сут.

2. МЕТОД ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ГРИБОВ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ

Оценку чувствительности к дезинфектантам проводят при экспозициях и концентрациях, рекомендуемых в инструкциях по применению дезинфицирующих средств и других режимах по выбору исследователя.

2.1. Подготовка 96-луночной планшеты

Для проведения исследования используют одноразовые стерильные 96-луночные планшеты. После извлечения планшеты из стерильной упаковки проводят ее разметку. На крышке, в горизонтальных рядах лунок обозначают концентрации растворов дезинфектантов. После каждого ряда лунок с раствором дезинфектанта следует ряд с нейтрализатором, так как использование нейтрализации дезинфицирующих средств является обязательным этапом.

2.2. Приготовление инокулюма

Для проведения исследования используют чистую культуру дрожжей, выращенную в течении 18-24 часов на скошенном агаре Сабуро при температуре $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Инокулюм готовят суспензированием культуры дрожжей в 0,85 % стерильном растворе NaCl до соответствия стандарту мутности $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл по McFarland (Standard 4.0).

2.3. Приготовление растворов дезинфектантов

Дезинфектанты разводят в стерильной водопроводной воде комнатной температуры в асептических условиях до рабочих для каждого средства концентраций и в иных, например, 1/2, 1/4, и т.д. от рабочих.

2.4. Проведение исследования

Согласно протоколу исследования, разметке планшеты, в горизонтальные ряды лунок вносят по 90 мкл растворов дезинфектантов с последующим добавлением в них 10 мкл стандартизированной суспензии дрожжей. Планшеты инкубируют при комнатной температуре с определенной экспозицией для каждого дезинфектанта. Затем из содержимого лунок с дезинфектантом и культурой переносят по 20 мкл смеси в лунки с раствором нейтрализатора. После 10-минутной экспозиции в нейтрализаторе 15-20 мкл высевают на чашки Петри с агаром Сабуро по трафарету. После высыхания посевов на поверхности агара чашки помещают в термостат верх дном и инкубируют при температуре $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов. Для учета результатов чашку ставят дном на заранее подготовленный трафарет и отмечают наличие роста в зонах посевов.

Окончательный учет результатов проводят через 48 часов. Наличие роста на поверхности среды хотя бы одной колонии свидетельствует об устойчивости испытуемой культуры к дезинфектанту в данной концентрации при определенной экспозиции.

2.5. Контроль

Проведение исследований сопровождается контролем культуры грибов. В момент выполнения исследования, при переносе содержимого лунок с дезинфектантам и тест-культурой грибов в раствор нейтрализатора, в контроле

– в отдельную лунку с нейтрализатором внести 10 мкл стандартизированной суспензии испытуемой культуры дрожжей, с последующим высевом контроля на чашки с агаром Сабуро параллельно с исследованием.

3. МЕТОД ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ГРИБОВ К АНТИСЕПТИКАМ

3.1. Подготовка 96-луночной планшеты

На крышке планшеты в горизонтальных рядах обозначают названия антисептиков и их последующие двойные разведения, в вертикальных – номера исследуемых клинических изолятов.

3.2. Приготовление инокулюма

Приготовление инокулюма проводят согласно п.2.2 настоящей инструкции, со стандартизацией до $9,0 \times 10^8$ КОЕ/мл по McFarland (Standard 3.0).

3.3. Приготовление основных разведений антисептиков

В бульоне Сабуро готовят основные разведения антисептиков в соотношении 1/4 от исходных рабочих концентраций.

3.4. Проведение исследования

В обозначенные горизонтальные ряды лунок вносят по 300 мкл основных разведений антисептиков, а в последующие ряды – по 150 мкл бульона Сабуро. Из лунок с основными разведениями пипеткой забирают по 150 мкл средства с последовательным перенесением данного объема в ряды лунок со средой Сабуро. Из лунок с последним разведением объемом 150 мкл удаляют.

После разведения антисептиков в лунки вносят стандартизованные суспензии тест-культур в объеме 30 мкл. Планшеты закрывают крышками и помещают в термостат на 24 часа при $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Спустя время инкубации по 15-20 мкл содержимого лунок высевают на чашки Петри с агаром Сабуро по трафарету. Чашки помещают в термостат на 48 часов с последующим учетом роста на поверхности среды. Наличие роста хотя бы одной колонии свидетельствует об устойчивости тест-культуры к данному разведению антисептика.

Для дифференциации микостатического и микоцидного действия антисептика перед высевом на агар Сабуро в лунки с антисептиком и культурой вносят по 50 мкл нейтрализатора с последующей 10-ти минутной экспозицией. Спустя это время содержимое лунок высевают на чашки с агаром Сабуро по трафарету.

3.5. Контроли

Проведение исследования сопровождается контролями.

КК – контроль культуры; в лунки с 150 мкл бульона Сабуро вносят 30 мкл стандартизированной исследуемой тест-культуры.

КС – контроль питательной среды; в лунки с 150 мкл бульона Сабуро других ингредиентов не вносят.

Содержимое лунок контролей высевают на чашки с агаром Сабуро одновременно с выполнением основного исследования.

3.6. Показатели и критерии оценки устойчивости грибов к антисептикам

Показателями чувствительности-устойчивости грибов являются:

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;

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

Тест-культура считается устойчивой при наличии роста после воздействия антисептических средств в разведении 1/2–1/4 от рабочей концентрации.

Изоляты *C. albicans*

		231	343	контроли	
Хлоргексидин	1/2	● ● ●	● ● ●	● ● ●	КК1
	1/4	● ● ●	● ● ●	● ● ●	КК2
	1/8	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
Мукосанин	1/2	● ● ●	● ● ●	● ● ●	КС
	1/4	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
	1/8	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
Бетадин	1/2	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
	1/4	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
	1/8	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
Хиндиокс	1/2	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
	1/4	● ● ●	● ● ●	● ● ●	
	1/8	● ● ●	● ● ●	● ● ●	

Рисунок 1. Разметка планшеты.

Примечание:

К1 – контроль культуры №231;

К2 – контроль культуры №343;

КС – контроль среды.