Утверждаю
Руководитель
Департамента
Госсанэпиднадзора
Минздрава России
А.А.МОНИСОВ
10 января 2000 г. N 1100/27-0-117

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УСКОРЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФЕКЦИОННЫМ СРЕДСТВАМ

Методические рекомендации разработаны Испытательным лабораторным центром Московского городского центра дезинфекции.

Авторы: Руководитель ИЛЦ МГЦД д.м.н., профессор Леви М.И. и д.м.н., профессор Сучков Ю.Г.

1. Общие положения

Настоящие Методические рекомендации предназначены для ускоренного определения устойчивости к дезинфекционным средствам аэробных бактерий. Объектом исследования могут служить любые бактериальные культуры, в том числе с подозрением на приобретение повышенной устойчивости.

Способ основан на применении цветной питательной среды, изменяющей цвет под влиянием жизнедеятельности размножающихся бактерий. Эффективные концентрации дезинфектанта предотвращают накопление бактерий и сохраняют цвет среды.

Ускоренное определение устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам возможно как в специализированных медицинских учреждениях, так и в бактериологических лабораториях больниц и санэпидслужбы.

2. Ингредиенты и методика анализа

2.1. Дистиллированная вода (pH не ниже 6,0) - применяют для приготовления питательной среды и начальных разведений раствора дезинфекционных препаратов.

2.2. Жидкая цветная питательная среда разработана в качестве универсальной для определения чувствительности к разным дезинфектантам большинства патогенных аэробных бактерий.

Основой служит питательный бульон из панкреатического гидролизата рыбокостной муки с добавлением 0,5% глюкозы и 0,002% индикатора бромкрезолового пурпурного. С помощью раствора 1%-го NaOH pH цветной питательной среды доводят до 7,6 - 7,7. Среду стерилизуют в автоклаве при 120 °C в течение 20 мин. Стерильная питательная среда имеет pH 7,2 - 7,4, окрашена в яркий сиреневый цвет. При температуре 4 - 6 °C среда сохраняется не менее 3-х лет.

Цветная питательная среда способна поддерживать рост единичных клеток эталонных культур бактерий - Echerichia coli, Staphilococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus cereus и других видов аэробных бактерий, ферментирующих глюкозу.

Для более прихотливых бактерий (роды Brucella, Francisella и некоторые другие) следует применять специальные цветные питательные среды.

2.3. Определение устойчивости бактериальных культур к дезинфекционным средствам

Бактериальную культуру выращивают на питательном агаре 20 - 24 часа при оптимальной для данного вида бактерий температуре. Микробный урожай с поверхности агара снимают шпателем и 0,85%-ным раствором натрия хлорида. В стерильных пробирках Эппендорфа или в инсулиновых флаконах готовят следующие

gost.e-ecolog.ru

концентрации бактерий: 1×10^7, 5×10^7 и 10×10^7 м. кл. в 50 мкл (на каждую концентрацию берут по 2 - 3 пробирки или флакона). Туда же приливают по 100 мкл цветной питательной среды, после чего сосуды переносят в термостат на 4 часа при оптимальной для данного вида бактерий температуре. Если за указанное время исходный цвет питательной среды изменится на желтый, то для данной культуры применим описанный в настоящих Методических рекомендациях способ определения устойчивости.

Анализы проводят в стерильных 96-луночных пластмассовых планшетах разового пользования с объемом лунок 200 мкл. Во все лунки вносят по 100 мкл цветной питательной среды. В первые лунки вносят по 100 мкл начального разведения раствора дезинфекционных препаратов на дистиллированной воде, равного удвоенной концентрации, рекомендованной для практики. Поэтому начальным разведением служит та концентрация, которая рекомендована для практического применения, или более низкая, если препарат в обычной концентрации неблагоприятно влияет на окраску цветной питательной среды.

На каждый дезинфекционный препарат отводят горизонтальный ряд лунок, в котором готовят с 2-кратным шагом разведения конкретного препарата в цветной питательной среде. Титрование проводят 8-канальной автоматической пружинной пипеткой со стерильными съемными наконечниками. Число дезинфекционных препаратов, включенных в испытание, соответствует числу горизонтальных рядов планшета. Можно для титрования пользоваться одноканальными пипетками.

Обязательные контроли:

1. 2 лунки с питательной средой (100 мкл), куда вносят 50 мкл испытуемой культуры бактерий (5×10^7 м. кл.).
2. Цветная питательная среда в объеме 150 мкл, 2 лунки.
3. Первые три разведения каждого дезинфекционного средства на цветной питательной среде по 150 мкл.

В лунки с разведениями дезинфекционных средств и контрольные лунки (кроме контроля 2) вносят по 50 мкл взвеси бактерий (5×10^7 м. кл.). Пластины накрывают крышками и переносят в термостат с температурой, оптимальной для данного вида бактерий. Следят за тем, чтобы жидкость в лунках не касалась крышки.

3. Учет результатов анализа

3.1. Некоторые дезинфекционные средства в низких концентрациях могут несколько искажать интенсивность цвета питательной среды. Убедительными изменениями следует считать результаты, если цвет питательной среды приобрел явно желтую или оранжевую окраску.

В случае запаздывания с изменением цвета питательной среды в контроле 1 п. 2.3 (в лунках нет дезинфекционного препарата) учет результатов переносят еще на 2 часа, оставив планшет в термостате, или до следующего дня - при комнатной температуре. В последнем случае появляется возможность кроме изменения цвета учитывать еще один признак - помутнение питательной среды в лунках. Этот дополнительный признак приобретает решающее значение в тех случаях, когда дезинфекционный препарат сам по себе изменяет окраску питательной среды и тем самым затрудняет учет по изменению цвета. Использование мутности для учета результатов невозможно для тех дезинфекционных препаратов, которые при добавлении к цветной питательной среде образуют выраженную опалесценцию.

Возможна регистрация результатов ускоренного определения чувствительности бактериальных культур к дезинфекционным препаратам по изменению цвета питательной среды инструментальным способом. Для этого по окончании экспозиции и учета результатов визуальным способом (необходимо, чтобы в контрольных лунках с культурой среда изменила исходный цвет на желтый) во все лунки планшета добавляют по 50 мкл 1% раствора фенола. Через 30 минут планшет помещают в аппарат типа Multiscan с фильтром 450 nm и получают в распечатке цифровые эквиваленты интенсивности желтого цвета в лунках.

3.2. Оценка учета результатов анализа

Бактериальную культуру следует признать устойчивой к действию конкретного дезинфекционного препарата, если в ускоренном способе его концентрация, рекомендованная для практики, не оказывает губительного действия, т.е. в лунках с такой концентрацией средства цвет питательной среды меняется на желтый, а также регистрируется мутность.

Убедительность подобного заключения возрастает, если параллельно в испытания была включена эталонная бактериальная культура того же вида, о которой заранее известно, что она не обладает повышенной устойчивостью к данному дезинфекционному препарату, и это подтверждается в конкретном испытании.

Результат учета целесообразно оформлять в специальном бланке (Приложение 1).

4. Меры предосторожности

Все манипуляции, связанные с определением чувствительности бактерий к дезинфектантам, проводят в специальных лотках (кюветах), которые вместе с содержимым переносят в термостат. По окончании анализа все материалы подлежат обеззараживанию посредством погружения в раствор, например, 6%-ной перекиси водорода. Многократно промытые водой предметы стерилизуют при 120 °С в течение 45 мин. в автоклаве. Предметы однократного пользования обеззараживают и утилизируют.

Успех применения ускоренного определения устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам в значительной мере зависит от квалификации исполнителей и наличия необходимых ингредиентов. Стандартизация условий проведения анализов ускоренным методом может быть достигнута при наличии специальных наборов, составленных для разным образом оснащенных лабораторий (Приложение 2).

Приложение 1

РЕЗУЛЬТАТЫ
определения чувствительности бактериальных культур к дезинфекционным препаратам

Анализ N

Время начала исследования _____
Бактериальная культура _____
Источник и место выделения культуры _____
Подозреваемая устойчивость культуры к следующим дезинфекционным препаратам _____

Группа	Наименование дезинфекционного препарата	Активнодействующее вещество (АДВ)	Процент АДВ, рекомендованный для практики	Результаты исследования	
				предельная активность препарата (по АДВ), цвет/ мутность <*>	заключение о чувствительности культуры к препарату <**>

<*> Если кроме цвета учитывают мутность, то результаты приводят в виде дроби.

<**> Культуру относят к разряду чувствительных или устойчивых к конкретному препарату.

Время сообщения о результате анализа _____
(число, время)

Подпись лица, производившего анализ _____

Подпись руководителя бактериологической лаборатории _____
(тел., факс)

Приложение 2

СТАНДАРТНЫЕ НАБОРЫ

Минимальный набор

1.	Флакон с цветной питательной средой, 10 мл	- 1 шт.
2.	Планшет 96-луночный, стерильный	- 2 шт.
3.	Флакон с раствором фенола 1%, 5 мл	- 1 шт.
4.	Методические рекомендации по ускоренному определению устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам	- 1 экз.
5.	Бланк для учета результатов	- 2 шт.
6.	Перечень ингредиентов минимального набора	- 1 экз.

Полный набор

1 - 6.	То же, что и в минимальном наборе	
7.	Резиновые перчатки	- 1 пара
8.	Защитная маска	- 1 шт.
9.	Лоток (кювет)	- 1 шт.
10.	Емкость для дезинфекции предметов	- 1 шт.
11.	Препарат для дезинфекции предметов	- 1 упак.
12.	Набор флаконов с растворами дезинфекционных препаратов основных групп	- 1 набор
13.	Флакон со стерильной дистиллированной водой	- 1 шт.

Максимальный набор

1 - 13.	То же, что и в полном наборе	
14.	Автоматическая пипетка одноканальная с наконечниками	- 1 шт.
15.	Автоматическая пипетка 8-канальная с наконечниками	- 1 шт.
16.	Портативный термостат на 37 °С	- 1 шт.

gost.e-ecolog.ru