Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

3.5.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Биологический метод дезинфекции с использованием бактериофагов

Методические рекомендации
МР 3.5.1.0101—15

Издание официальное

Москва • 2016

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.5.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Биологический метод дезинфекции с использованием бактериофагов

Методические рекомендации
МР 3.5.1.0101—15

ББК 51.9
Б63

Б63 **Биологический** метод дезинфекции с использованием бактериофагов Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—12 с.

ISBN 978—5—7508—1490—9

1. Разработаны ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН (О. М. Дроздова, Е. Б. Брусина, А. А. Цитко); ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора, ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Н. В. Шестопалов, В. Г. Акимкин, Л. С. Федорова, Л. Г. Пантелеева, Т. Н. Шестопалова); ГБОУ ВПО «Северо-Западный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Л. П. Зуева, Б. И. Асланов); ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» (А. В. Алешкин, Е. П. Селькова).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 27 мая 2015 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.9

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная вёрстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 26.05.16

Формат 60x84/16 Печ. л. 0,75

Тираж 150 экз. Заказ 34

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

Содержание

I. Область применения 4

II. Общие положения 4

III. Требования к бактериофагам, рекомендуемым для дезинфекции биологическим методом 5

IV. Организация и проведение дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов 6

V. Схемы использования бактериофагов 8

Приложение 1. Наименование лечебно-профилактических бактериофагов и их специфическая направленность 9

Приложение 2. Определение литической активности бактериофага по Аппельману 10

Приложение 3. Определение литической активности бактериофага 11

Приложение 4. Определение бактериофагов на объектах внешней среды в медицинских организациях 12

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
27 мая 2015 г.

3.5.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Биологический метод дезинфекции с использованием бактериофагов

Методические рекомендации МР 3.5.1.0101—15

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее – МР) содержат данные, необходимые для организации и проведения селективной дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов как средства профилактики инфекционных болезней, связанных с оказанием медицинской помощи, и носят рекомендательный характер.

1.2. Настоящие МР предназначены для руководителей и специалистов медицинских организаций, врачей-эпидемиологов, микробиологов, дезинфектологов, а также должностных лиц органов, уполномоченных осуществлять федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

II. Общие положения

2.1. В медицинских организациях существует высокий риск формирования госпитальных клонов (штаммов) микроорганизмов, которые могут накапливаться на объектах больничной среды и способствовать групповой заболеваемости пациентов с высокой летальностью. Формируемые госпитальные клоны (штаммы) микроорганизмов часто характеризуются устойчивостью к действию антимикробных средств, в том числе к антибиотикам, химическим дезинфицирующим средствам и антисептикам.

2.2. Дезинфекция биологическим методом с использованием бактериофагов наиболее целесообразна в эпидемиологически значимых специализированных отделениях медицинских организаций (отделения ин-

тенсивной терапии и реанимации, ожоговые), применение химических дезинфицирующих средств в которых нередко ограничено невозможностью регулярного освобождения помещений от больных, насыщенностью этих отделений большим количеством сложных медицинских аппаратов и систем слежения за жизненно важными функциями организма пациентов.

2.3. В случае распространения госпитального клона (штамма) возбудителя инфекционного заболевания, устойчивого к химическим дезинфицирующим средствам и другим антимикробным препаратам, биологический метод дезинфекции с использованием бактериофагов является дополнительным направлением, значительно повышающим эффективность профилактических и противоэпидемических мероприятий.

2.4. Бактериофаги являются вирусами бактерий. По типу взаимодействия с бактериальной клеткой фаги классифицируются на вирулентные (вызывающие гибель бактерии) и умеренные (инфицируют бактериальную клетку, встраиваются в генетический аппарат бактерии и репродуцируются в процессе деления клетки). Для дезинфекции биологическим методом используют только вирулентные фаги.

2.5. Основное свойство бактериофагов – строгая специфичность, так как каждая разновидность фага способна взаимодействовать с определенным видом бактерий.

III. Требования к бактериофагам, рекомендуемым для дезинфекции биологическим методом

3.1. Для дезинфекции биологическим методом применяют препараты лечебно-профилактических бактериофагов, которые содержат комплексы поликлональных вирулентных (строго литических) бактериальных вирусов, вызывающих гибель гомологичных видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, сопровождающихся выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Для дезинфекции используются только жидкие препараты лечебно-профилактических бактериофагов, зарегистрированные на территории Российской Федерации.

3.2. Лечебно-профилактические бактериофаги представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий. Они освобождены от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, белковых и антигенных комплексов питательных сред, не обладают токсическим действием и не вызывают аллергизации. На литическую активность бактериофагов не влияет наличие резистентности бактерий к антибиотикам и химическим дезинфицирующим средствам.

3.3. Бактериофаги могут широко применяться в присутствии людей, в том числе недоношенных детей и беременных. Бактериофаги устойчивы во внешней среде, совместимы со многими химическими дезинфицирующими средствами.

3.4. Лечебно-профилактические бактериофаги по своему составу подразделяются на монокомпонентные бактериофаги – препараты, содержащие вирулентные фаги бактерий одного рода или вида, и комбинированные бактериофаги – препараты, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов (прилож. 1).

3.5. Активность бактериофагов определяется по методу Аппельмана или методом Грациа (агаровых слоев). При использовании метода Аппельмана литическую активность выражают в показателях титра максимального разведения, дающего полный фаголизис соответствующих препарату видов бактерий. Метод Грациа определяет концентрацию фаговых частиц в БОЕ на мл.

3.6. Перед применением бактериофагов необходимо определить чувствительность к ним бактериального возбудителя инфекционного заболевания (прилож. 2, 3).

IV. Организация и проведение дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов

4.1. Для обеспечения эффективной дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов в медицинской организации необходимо осуществлять микробиологический мониторинг, включающий динамическую оценку циркулирующих в ней микроорганизмов и их чувствительности к антибиотикам и дезинфицирующим средствам.

4.2. Показаниями к проведению дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов являются:

- регистрация эпидемиологического неблагополучия в медицинской организации, связанного с возникновением бактериальных инфекций;
- высокий риск появления и распространения инфекции, оцениваемый по данным эпидемиологического анализа и микробиологического мониторинга;
- наличие признаков формирования госпитального штамма (клона);
- выявление штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам и химическим дезинфицирующим средствам.

4.3. К признакам формирования госпитального штамма (клона) относятся резистентность к антибиотикам, устойчивость к химическим дезинфектантам, нарастание в структуре микрофлоры, существующей в медицинской организации, доли какого-либо генотипического или фенотипического вида патогенных бактерий с увеличением его циркуляции среди пациентов.

4.4. Решение о необходимости проведения дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов принимает заместитель главного врача по эпидемиологической работе (врач-эпидемиолог) медицинской организации.

4.5. Дезинфекция биологическим методом с использованием бактериофагов проводится медицинским персоналом медицинской организации собственными силами.

4.6. При проведении дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов жидкий препарат наносится на поверхности в помещениях, объекты, предметы. Используемый жидкий бактериофаг в заводской упаковке должен быть прозрачным и не содержать осадка. Вскрытие флакона с бактериофагом осуществляется с соблюдением правил асептики. Перед использованием флакон встряхивают. Вскрытый флакон должен быть использован в течение 2 часов.

4.7. Доза препарата при проведении дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов составляет 1—2 мл/м^2. Для достижения наибольшего эффекта бактериофаг наносится на объекты внешней среды методом распыления, для чего целесообразно использовать беспропеллентные аэрозольные упаковки однократного применения. Для снижения мешающего эффекта вспенивания препарата допускается его разведение физиологическим раствором в соотношении 1 : 1.

4.8. Бактериофаги наносятся на возможные места скопления возбудителей: рабочие и манипуляционные столы, поверхности шкафов с лекарственными препаратами, стойки для инфузионных систем, аппаратуру, стены, прикроватные тумбочки, столы и стулья в палатах, раковины, поручни кроватей, ручки дверей и т. д.

4.9. С целью элиминации возбудителя из наркозно-дыхательной аппаратуры бактериофаг вносится в увлажнитель.

4.10. Дезинфекция биологическим методом с использованием бактериофагов проводится в любое время суток, желательно за 3—4 часа до выполнения текущей (заключительной) дезинфекции химическими дезинфицирующими средствами или же через аналогичное количество времени после ее осуществления.

4.11. При правильном распылении на участках нанесения бактериофага виден мелкодисперсный слой. Таким нанесением фага обеспечивается интенсивная циркуляция бактериофагов во внешней среде, резко повышается вероятность его контакта с соответствующими бактериями, определяя высокую эффективность такого способа использования бактериофага.

4.12. При регистрации или высоком риске появления больных госпитальным сальмонеллезом и другими бактериальными острыми кишечными инфекциями обработка соответствующим возбудителю бактериофагом проводится в палатах для пациентов, туалетных и санитарных комнатах.

4.13. Контроль качества дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов осуществляется путем проведения микробиологических исследований смывов с обработанных поверхностей через 6—8 часов после проведения дезинфекции (прилож. 4).

4.14. В процессе проведения дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов врач-эпидемиолог (помощник врача-эпидемиолога) осуществляет визуальный контроль, который предполагает оценку технологии применения препарата во время дезинфекции.

V. Схемы использования бактериофагов

5.1. В соответствии с эпидемиологической ситуацией в медицинской организации и прогнозом ее развития используются две схемы дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов: интермиттирующая и однократная.

5.2. *Интермиттирующая схема* используется как мера профилактики возникновения и распространения инфекционных болезней в медицинской организации при высоком риске заноса (распространения) известного возбудителя инфекционной болезни.

5.3. Интермиттирующая схема предполагает регулярное, через каждые 3 дня, проведение дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов, соответствующим известному возбудителю инфекционной болезни.

Обработка проводится в течение времени, равному трем инкубационным периодам инфекционного заболевания, в отношении которого осуществляется профилактика (в среднем до 3 недель).

Интермиттирующую схему используют в отделениях реанимации и интенсивной терапии, гнойной хирургии, ожоговом и других отделениях высокого эпидемиологического риска возникновения инфекций.

5.4. *Однократная схема* дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов используется при интенсивном обсеменении больничной среды полирезистентным возбудителем или госпитальным штаммом (клоном), а также при заключительной дезинфекции после выведения больного инфекционным заболеванием из очага в медицинской организации.

5.5. При возникновении очага инфекционной болезни применяется как интермиттирующая, так и однократная схемы.

5.6. Применение биологического метода дезинфекции с использованием бактериофагов проводится согласно инструкции. Определение схемы применения биологического метода дезинфекции с использованием бактериофагов проводится после консультации с врачом-эпидемиологом.

5.7. Не рекомендуется непрерывное длительное (более 3 инкубационных периодов) использование бактериофага из-за риска формирования резистентных к фагу микроорганизмов. При отсутствии возбудителя бактериофаг элиминируется из больничной среды в течение 3 суток.

Приложение 1

Наименование лечебно-профилактических бактериофагов и их специфическая направленность

Наименование препарата	Специфическая направленность
Монопрепараты	
Бактериофаг стафилококковый	*Staphylococcus (S. aureus)*
Бактериофаг стрептококковый	*Streptococcus*
Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный)	*Pseudomonas aeruginosa*
Бактериофаг коли	*Энтеропатогенные Escherichia coli*
Бактериофаг протейный	*Proteus mirabilis и P. vulgaris*
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	*Shigella flexneri* 1, 2, 3, 4, 6 сероваров; *S. sonnei*
Бактериофаг брюшнотифозный	*Salmonella typhi*
Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE	*Salmonella typhimurium; S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. heidelberg, S. newport, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. infantis, S. dublin, S. enteritidis, S. anatum, S. newlands*
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный	*Klebsiella pneumoniae*
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный	*Klebsiella pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis*
Комбинированные препараты	
Бактериофаг колипротейный	*Энтеропатогенные Escherichia coli, Proteus mirabilis и P. vulgaris*
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	*Staphylococcus, Streptococcus, Proteus mirabilis, P. vulgaris, энтеропатогенные E. coli, Pseudomonas aeruginosa, K. pneumoniae*
Секстафаг® (пиобактериофаг поливалентный)	*Staphylococcus, Streptococcus, Proteus vulgaris, P. mirabilis, P. aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, энтеропатогенные E. coli*
Пиобактериофаг комплексный	*Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus sp., Proteus mirabilis, P. vulgaris, энтеропатогеные E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca*
Интести-бактериофаг	*Shigella flexneri 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, S. sonnei, Salmonella typhimurium, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. heidelberg, S. newport, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. infantis, S. dublin S. enteritidis, S. anatum, S. newlands, Proteus mirabilis и P. vulgaris, энтеропатогенные E. coli, Enterococcus, Staphylococcus, Pseudomonas aeruginosa*

Приложение 2

Определение литической активности бактериофага по Аппельману

Сущность метода заключается в определении максимального разведения бактериофага, в котором исследуемый фаг проявляет свое литическое действие.

1. В ряд из 12 стерильных пробирок одинакового диаметра наливают по 4,5 миллилитра стерильного мясо-пептонного бульона.

2. В первую пробирку вносят 0,5 мл испытуемого бактериофага.

3. Делают последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл фага. Обычно используют 10 пробирок. Из последней пробирки лишние 0,5 мл выливают.

4. Во все пробирки вносят по 1 капле 18-часовой бульонной культуры бактерий. 11-я и 12-я пробирки являются контрольными, в первой из которых находится бульон с одной каплей бульонной культуры без фага (контроль культуры), во второй – только бульон (контроль стерильности).

5. Все 12 пробирок помещают в термостат при 37 °С на 18 часов.

6. Титр фага устанавливают при встряхивании пробирок по последней прозрачной пробирке и выражают разведением фага.

Например, если последняя пробирка, в которой отмечена полная прозрачность мясо-пептонного бульона, по счету седьмая, то титр изучаемого фага равен 10^{-7}.

Приложение 3

Определение литической активности бактериофага

1. В чашку Петри с питательным агаром засевают бульонную культуру и подсушивают при 37 °С. Затем на поверхность газона наносят каплю фага, и наклоняют так, чтобы капля стекла к противоположному краю. После суточной инкубации в термостате просматривают чашки с целью выявления на ее поверхности зоны лизиса бактерий по месту стекания капли фага.

2. Распространенной практикой является оценка литической активности фага по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»):

«–» отсутствие литической активности;

«+» низкая активность;

«++» образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии;

«+++» зона лизиса с единичными колониями вторичного роста;

«++++» прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.

Для биологической дезинфекции допускается применение бактериофага, обладающего степенью лизиса не менее +++.

3. При количественном методе считают количество «стерильных» пятен (бляшек) на сплошном бактериальном газоне, что соответствует количеству фаговых частиц в засеянной смеси. Исходя из чего можно вычислить количество пятнообразующих (бляшкообразующих) единиц (БОЕ) в 1 мл исходной суспензии фага. Эта величина, характеризующая концентрацию фага, является его титром.

4. Для определения спектра литической активности бактериофага чашку с питательным агаром делят на квадраты, в каждый из которых наносят каплю соответствующей бульонной культуры и каплю испытуемого фага.

После инкубации отмечают те квадраты, где имеется сплошной лизис бактерий. По количеству различных бактериальных культур, которые лизируются испытуемым фагом, определяют широту спектра его литического действия.

Приложение 4

Определение бактериофагов на объектах внешней среды в медицинских организациях

1. Применение бактериофага в медицинских организациях контролируется обнаружением его в смывах с объектов внешней среды в отделениях, где применяли препарат.

2. Смывы забирают стандартным способом, тампоны помещают в пробирки с простым питательным бульоном.

3. В пробирки со смывами добавляют по 2 капли взвеси 18-часовой чистой культуры свежевыделенных бактерий, чувствительных к бактериофагу. Чувствительность предварительно может быть определена качественным методом. Пробирки со смывами инкубируют при 37 °С 18 часов.

4. После инкубации пробирки прогревают на водяной бане при температуре 56—60 °С в течение 30 минут для уничтожения посторонней микрофлоры. Для избавления от посторонней микрофлоры можно использовать также метод фильтрации содержимого инкубированных пробирок через бактериальные фильтры.

5. На чашки Петри с простым питательным агаром сплошным газоном засевают 18-часовую чистую культуру. Используется та же культура, на которой производилось подращивание фага.

6. Поверхность чашки делится на квадраты размером 3—4 $см^2$, в каждый из которых отградуированной на 5 мм петлей вносится по 1 капле прогретого содержимого пробирки (или фильтрата, если использовались бактериальные фильтры). Количество исследуемых смывов определяется количеством квадратов. Через 15—20 минут чашки помещают в термостат при 37 °С на 18 часов.

7. Результат исследования считается положительным, если на месте нанесения капли прогретого содержимого пробирок (или фильтрата) обнаруживается негативное (прозрачное) пятно лизиса бактерий. Размеры, форма и морфология его могут быть различными.

8. Результат дезинфекции считается успешным, если бактериофаг обнаруживается не менее чем в 75 % исследуемых смывов.

gost.e-ecolog.ru