
**Клинические лабораторные
исследования и испытательные
системы для *in vitro* диагностики.
Референсные методы для *in vitro*
исследования активности
антимикробных веществ против
дрожжевых грибов, вызывающих
инфекционные заболевания**

*Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems —
Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents
against yeast of fungi involved in infectious diseases*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 16256:2012(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16256:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2012

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по адресу ниже или представительства ISO в соответствующей стране.

Бюро авторского права ISO
Почтовый ящик 56 • CH-1211 Женева 20
Тел. + 41 22 749 01 11
Факс + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Термины и определения	1
3 Процедуры испытаний	5
3.1 Общие положения	5
3.2 Среда	5
3.3 Противогрибковые вещества	6
3.4 Хранение планшетов для микроразведения	9
3.5 Приготовление инокулята. Общие положения	9
3.6 Инокуляция планшетов для микроразведения	10
3.7 Инкубация планшетов для микроразведений	10
3.8 Результаты считывания показаний MIC	11
3.9 Интерпретация MIC	12
4 Контроль качества (quality control, QC)	12
Приложение А (информативное) Среда RPMI-1640	15
Приложение В (информативное) Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду с использованием сульфата бария	17
Приложение С (информативное) Приемлемое время считывания результатов для интерпретации MIC, используя визуальные процедуры определения MIC	18
Библиография	19

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов заключается в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

Международный стандарт ISO 16256 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 212, *Клинические лабораторные исследования и испытательные системы для in vitro диагностики*.

[ISO 16256:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

Введение

Испытания на чувствительность *in vitro* проводятся на микроорганизмах, для которых подозреваются, что они вызывают заболевания, особенно, если считается, что организм принадлежит к видам, которые могут приобретать устойчивость к часто используемым антимикробным веществам. Испытания также важны при контроле устойчивости, эпидемиологических исследованиях чувствительности и при сравнении новых и существующих веществ.

Процедуры разведения используются для определения минимальных ингибирующих концентраций (minimum inhibitory concentration, MIC) антимикробных веществ и представляют собой референсный метод для исследования противогрибковой чувствительности. Методы MIC используются для контроля устойчивости, для сравнительных испытаний новых веществ для исследовательских целей или регистрации, для определения чувствительности организмов, которые дают неоднозначные результаты в рутинных испытаниях, для исследования организмов, для которых рутинные испытания могут быть недостоверными и когда для клинических целей необходим количественный результат. В испытаниях с разведением исследуется способность микроорганизмов давать заметный рост на группе агаровых пластин (агаровое разведение) или в бульоне (разведение в бульоне), содержащих ряд разведений антимикробного вещества.

Наименьшая концентрация антимикробного вещества (в мг/л), которая в определенных условиях для *in vitro* испытаний снижает видимый или оптически измеряемый рост микроорганизмов в течение определенного периода времени, известна как MIC. MIC является ориентиром для врачей по чувствительности организмов к антимикробным веществам и облегчает принятие решения о лечении. Для воспроизводимости внутри и между лабораториями необходим тщательный контроль и стандартизация, т.к. на результаты может влиять используемый метод. Общепринято, что испытания на MIC в бульоне воспроизводимы в пределах одного удвоенного разведения относительно исходной точки (т.е. ± 1 ячейка или пробирка в серии удвоенных разведений).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866->

Разведение в бульоне – это методика, в которой контейнеры, содержащие идентичные объемы бульона с растворами антимикробных веществ, заселяются известным числом микроорганизмов со ступенчато увеличивающейся (обычно в два раза) концентрацией.

Микроразведение в бульоне означает проведение испытаний с разведением в бульоне в лотках для микроразведения.

Референсные методы, описанные в данном международном стандарте, предназначены для испытания чистых культур дрожжевых грибов. Методы микроразведения в бульоне, описанные в данной части международного стандарта, в целом те же самые, что и описанные Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[1] и Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)^[2]. Показано, что эти методы дают MIC флуконазола практически равную, если не абсолютно равную 2 мг/л^[3]. Исследования с различными другими противогрибковыми веществами планируются или находятся на стадии реализации. Лаборатория, которая хочет использовать данный международный стандарт для проведения исследований новейших противогрибковых веществ или в качестве референсного метода для сравнения MIC, полученных диагностическим оборудованием, должна выбрать, какие параметры процедуры использовать исходя из того, определяются ли показания MIC визуальной инспекцией (CLSI метод) или с использованием спектрофотометра (EUCAST метод). В любом случае, необходимо строго следовать деталям процедуры для данных параметров.

Клинические лабораторные исследования и испытательные системы для *in vitro* диагностики. Референсные методы для *in vitro* исследования активности антимикробных веществ против дрожжевых грибов, вызывающих инфекционные заболевания

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Использование данного международного стандарта может включать опасные материалы, действия и оборудование. Данный международный стандарт не предназначен для рассмотрения всех проблем безопасности, связанных с его использованием. Пользователь данного международного стандарта ответственен за установление соответствующих безопасных и здоровых процедур и определение применимости нормативных ограничений до использования.

1 Область применения

В данном международном стандарте описан метод испытания чувствительности дрожжевых грибов к противогрибковым веществам, включая кандиду и криптококки, которые вызывают инфекционные заболевания. Референсный метод, описанный здесь, не используется в исследованиях дрожжей диморфных грибов, таких как *B. dermatitidis* и/или *H. capsulatum*. Кроме того, исследование мицелиальных грибов (плесени) вносит несколько дополнительных проблем в стандартизацию, не рассматриваемых в данной процедуре. Референсные методы для исследования чувствительности к противогрибковым препаратам мицелиальных грибов методом разведения в бульоне были разработаны и в настоящее время доступны в документах CLSI M38 и EUCAST E.DEF 9.1^{[4][5][6][7][8]}.

В данном международном стандарте описан референсный метод микроразведений разведения в бульоне, который может быть реализован двумя различными способами. Один способ включает визуальное определение MIC (CLSI метод)^[1]; второй способ включает спектрометрическое определение MIC (EUCAST метод)^[2]. MIC отражает активность лекарства в описанных испытательных условиях и может быть интерпретирована в целях клинического менеджмента с учетом других факторов, таких как фармакология лекарства или механизмы противогрибковой устойчивости. По MIC можно классифицировать на “чувствительный” (susceptible, S), “чувствительный с учетом дозы” (susceptible dose-dependent, S-DD), “с промежуточной устойчивостью” (intermediate, I), “не чувствительный” (non-susceptible, NS) или “устойчивый” (resistant, R). Кроме того, распределение MIC может использоваться для определения является ли популяция грибов популяцией дикого типа или не дикого типа. Клиническая интерпретация значения MIC выходит за пределы области применения данного международного стандарта; контрольные точки для определения категорий, характерные для CLSI и EUCAST методов, можно найти просмотрев последние таблицы для интерпретации результатов, представленные организациями^{[2][9]}. Целесообразно сравнивать рутинные методы определения чувствительности или диагностические устройства для испытаний в эталонным методом для обеспечения получения сравнимых достоверных результатов для целей валидации или регистрации.

2 Термины и определения

В рамках данного документа применяются следующие термины и определения.

2.1
противогрибковое вещество
antifungal agent
вещество биологического, полусинтетического или синтетического происхождения, которое уменьшает рост или убивает грибки и, следовательно, может потенциально использоваться в лечение инфекций

ПРИМЕЧАНИЕ Дезинфицирующие вещества, антисептики и консерванты не включаются в данное определение.

2.2
противогрибковые вещества — свойства

2.2.1
содержание действующих веществ
potency
активная часть испытываемого вещества, определенная при количественном определении биологической активности по сравнению с референсным порошком того же вещества

ПРИМЕЧАНИЕ Содержание действующих веществ выражается как массовая доля в миллиграммах на грамм (мг/г), или как содержание действующих веществ в международных единицах (МЕ) на грамм, или как объемная доля или массовая доля в процентах, или как концентрация количества вещества (массовая доля) в моль на литр ингредиентов испытываемого вещества.

2.2.2
концентрация
concentration
количество противогрибкового вещества в определенном объеме жидкости

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Концентрация выражается в мг/л.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 мг/л = мкг/мл, однако, использование единицы мкг/мл не рекомендуется.

2.3
основной раствор
stock solution
исходный раствор, используемый для дальнейших разведений

2.4
минимальная ингибирующая концентрация
minimum inhibitory concentration
MIC
наименьшая концентрация, которая в определенных испытательных *in vitro* условиях, снижает рост на определенное значение за определенный промежуток времени

ПРИМЕЧАНИЕ MIC выражается в мг/л.

2.5
контрольная точка
breakpoint
BP
определенные значения MIC, которые могут использоваться для разделения грибков на клинические категории “чувствительный”, “чувствительный с учетом дозы,” “с промежуточной устойчивостью,” “нечувствительный” и “устойчивый”

ПРИМЕЧАНИЕ Для текущих контрольных точек для интерпретации можно сослаться на последние публикации организаций, применяющих референсный метод (например, CLSI и EUCAST)^{[1][2][9]}.

2.5.1**получение визуальных показаний****2.5.1.1****чувствительные****susceptible****S**

штамм грибов подавляется *in vitro* концентрацией противогрибкового вещества, которая связана с высокой вероятностью терапевтического успеха

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Штамм грибов относят к категории чувствительные с использованием соответствующих контрольных точек в определенной фенотипической испытательной системе.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Данная контрольная точка в некоторых случаях может изменяться (например, при изменении общеиспользуемых доз лекарств, появлении нового механизма устойчивости).

2.5.1.2**чувствительные с учетом дозы****susceptible dose-dependent****S-DD**

штамм грибов подавляется *in vitro* концентрацией противогрибкового вещества, которая может быть достигнута *in vivo*, используя дозы вещества больше обычных, если эти схемы использования можно безопасно реализовать

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Штамм грибов относят к категории чувствительные с учетом дозы с использованием соответствующих контрольных точек в определенной фенотипической испытательной системе.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Данный класс чувствительности подразумевает, что из-за изолированности инфекции, она может быть соответствующим образом пролечена в тех областях тела, где физиологически накапливаются лекарственные вещества или если могут использоваться высокие дозы лекарственных веществ.

ПРИМЕЧАНИЕ 3 Данная контрольная точка в некоторых случаях может изменяться (например, при изменении общеиспользуемых доз лекарств, появлении нового механизма устойчивости).

2.5.1.3**с промежуточной устойчивостью****intermediate****I**

микроорганизмы, для которых уровень активности противомикробного вещества связан с сомнительным терапевтическим эффектом

ПРИМЕЧАНИЕ Это подразумевает, что из-за изолированности инфекции, она может быть соответствующим образом пролечена в тех областях тела, где физиологически накапливаются лекарственные вещества или если могут использоваться высокие дозы лекарственных веществ; это также показывает на наличие буферной зоны, которая предотвращает то, что небольшие неконтролируемые технические факторы будут вызывать крупные несоответствия в интерпретации.

2.5.1.4**с универсальной чувствительностью****nonsusceptible****NS**

категория, используемая для дрожжевых грибов, которые в настоящее время имеют единственную категорию для интерпретации – чувствительные, при этом категории чувствительные с учетом дозы, с промежуточной устойчивостью или устойчивые отсутствуют

ПРИМЕЧАНИЕ Данная категория часто присваивается новым противогрибковым веществам, для которых еще не были обнаружены устойчивые изоляты.

2.5.1.5
устойчивые
resistant
R

штамм грибков подавляется *in vitro* такой концентрацией противогрибкового вещества, которая связана с высокой вероятностью терапевтического отказа

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Штамм грибков относят к категории устойчивые с использованием соответствующих контрольных точек в определенной фенотипической испытательной системе

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Данная контрольная точка в некоторых случаях может изменяться (например, изменения общеиспользуемых доз лекарств, появления нового механизма устойчивости).

2.5.2
получение спектрофотометрических показаний
2.5.2.1

чувствительные
susceptible
S

микроорганизмы, для которых уровень активности противомикробного вещества связан с высокой вероятностью терапевтического успеха

2.5.2.2
с промежуточной устойчивостью
intermediate

I
микроорганизмы, для которых уровень активности противомикробного вещества связан с сомнительным терапевтическим эффектом

ПРИМЕЧАНИЕ Это подразумевает, что из-за изолированности инфекции, она может быть соответствующим образом пролечена в тех областях тела, где физиологически накапливаются лекарственные вещества или если могут использоваться высокие дозы лекарственных веществ; это также показывает на наличие буферной зоны, которая предотвращает то, что небольшие неконтролируемые технические факторы будут вызывать крупные несоответствия в интерпретации.

2.5.2.3
устойчивые
resistant
R

микроорганизмы, для которых уровень активности противомикробного вещества связан с высокой вероятностью терапевтического отказа

2.6
дикий тип
wild type

отсутствие приобретенных механизмов устойчивости к противогрибковым веществам для данного штамм грибков

2.7
референтный штамм
reference strain

хорошо описанный штамм грибков из каталога со стабильной, определенной противогрибковой чувствительностью фенотипа и/или генотипа

ПРИМЕЧАНИЕ Референтные штаммы поддерживаются как исходные культуры из которых получают рабочие культуры. Они получают из коллекций культур и используются для контроля качества.

2.8

методы исследования чувствительности susceptibility testing method

2.8.1

разведение в бульоне broth dilution

методика в которой контейнеры заполняются соответствующими объемами противогрибковых растворов, применяя ступенчатое (обычно в два раза) увеличение концентраций противогрибкового вещества, и соответствующими объемами бульона с определенным инокулятом

ПРИМЕЧАНИЕ Целью данного метода является определение MIC.

2.8.2

микроразведения microdilution

выполнение разведений в бульоне в ячейках для микроразведений с емкостью ≤ 300 мкл на ячейку

2.9

бульон broth

жидкая среда, используемая для роста дрожжевых грибов *in vitro*

2.10

инокулят inoculum

определенное количество грибов в суспензии, вычисленное по отношению к конечному объему

ПРИМЕЧАНИЕ Инокулят обычно выражается в колониеобразующих единицах на миллилитр (КОЕ/мл).

2.11

влияние инокулята inoculum effect

изменение MIC, связанное с изменением инокулята

3 Процедуры испытаний

3.1 Общие положения

Испытания проводятся в пластиковом одноразовом планшете для микроразведений. Метод основан на подготовке рабочих растворов противогрибкового вещества двойной крепости объемом 100 мкл на ячейку с добавлением инокулята также в объеме 100 мкл.

3.2 Среда

3.2.1 Общие положения

Должен использоваться бульон RPMI-1640 (См. Приложение А на предмет деталей по подготовке двух видов бульона с глюкозой RPMI-1640).

3.2.2 Получение визуальных показаний

Среда RPMI-1640 должна содержать 0,2 % глюкозы. Бульон RPMI-1640 готовится и распределяется одинарной крепости с раствором противогрибкового вещества двойной крепости и инокулят, содержащий отрегулированный объем суспензии грибка для инокулирования, добавляется в равный объем бульона RPMI-1640.