

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КОНТРОЛЮ
ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
(НП «НАСКИ»)**

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К
ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ
ПРИ МОНИТОРИНГЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ
ПРЕПАРАТАМ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ**

Федеральные клинические рекомендации

Апрель, 2015

Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях. Федеральные клинические рекомендации. – М., 2015.- 27 с.

Разработаны коллективом авторов:

- Шкарин В.В. Член-корр. РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России
- Ковалишена О.В. Д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, заместитель директора по науке НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России
- Благонравова А.С. Д.м.н., директор НИИ профилактической медицины, профессор кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России
- Широкова И.Ю. К.м.н., заведующая проблемной научной лабораторией микробиологии НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России

Экспертный совет: Брико Н.И. – академик РАН, д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России, председатель НП «НАСКИ» (Москва); Брусина Е.Б. – д.м.н., проф., зав.кафедрой ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России в Сибирском федеральном округе и в Кемеровской области (Кемерово); Зуева Л.П. – д.м.н., проф., зав.кафедрой ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России в Северо-Западном федеральном округе (Санкт-Петербург); Стасенко В.Л. - д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО ОГМУ Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава Омской области (Омск); Фельдблюм И.В. – д.м.н., проф., зав.кафедрой эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (Пермь).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Согласованы на заседании Профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по эпидемиологии 14 апреля 2015, протокол №5.

Утверждены на Общем собрании членов Национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи 13.04.2015, протокол №8, в рамках Межрегиональной научно-практической конференции «Обеспечение эпидемиологической безопасности в системе родовспоможения» 13-15 апреля 2015 г., г. Саранск.

В настоящих Федеральных клинических рекомендациях изложен метод оценки состояния чувствительности к дезинфицирующим средствам патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих различные инфекционные заболевания, включая и инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, кишечные инфекции. Предназначены для специалистов бактериологических лабораторий, врачей-эпидемиологов медицинских организаций, врачей различных специальностей с целью осуществления мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам в медицинской организации как компонента эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

СОДЕРЖАНИЕ

1. МЕТОДОЛОГИЯ.....	4
2. ВВЕДЕНИЕ.....	8
3. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	111
4. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	111
5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	132
6. МИКРООРГАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ.....	133
7. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ.....	14
8. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ.....	144
9. НЕЙТРАЛИЗАТОРЫ.....	155
10. ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ.....	177
11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ В РАСТВОРЕ.....	188
12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ ПРИ ДЕЗИНФЕКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ.....	1919
13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	211
14. ОЦЕНКА МЕТОДИКИ.....	233
15. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	27

1. МЕТОДОЛОГИЯ

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств: поиск в электронных базах данных

Таблица 1

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций

Уровни доказательств	Описание
1++	Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), или РКИ с очень низким риском систематических ошибок
1+	Качественно проведенные мета-анализы, систематические обзоры, или РКИ с низким риском систематических ошибок
1-	Мета-анализы, систематические обзоры, или РКИ с высоким риском систематических ошибок
2++	Высококачественные систематические обзоры исследований типа «случай-контроль» или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований типа «случай-контроль» или когортных исследований с очень низким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2+	Хорошо проведенные исследования типа «случай-контроль» или когортные исследования со средним риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2-	Исследования типа «случай-контроль» или когортные исследования с высоким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
3	Не аналитические исследования (например: описание случаев, серий случаев)
4	Мнение экспертов

Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств: консенсус экспертов; оценка значимости в соответствии с рейтинговой схемой (схема прилагается).

Методы, использованные для анализа доказательств: обзоры опубликованных мета-анализов; систематические обзоры с таблицами доказательств.

Таблица 2

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций

Сила	Описание
А	По меньшей мере, один мета-анализ, систематический обзор, или РКИ, оцененные, как 1++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие устойчивость результатов или группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 1+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов
В	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 2++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 1++ или 1+
С	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 2++
Д	Доказательства уровня 3 или 4 или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 2+

Описание методов, использованных для анализа доказательств

При отборе публикаций, как потенциальных источников доказательств, использованная в каждом исследовании методология изучалась для того, чтобы убедиться в ее валидности. Результат изучения влиял на уровень доказательств, присваиваемый публикации, что в свою очередь влияло на силу вытекающих из нее рекомендаций.

Методологическое изучение базировалось на нескольких ключевых вопросах, которые сфокусированы на тех особенностях дизайна

исследования, которые оказывают существенное влияние на валидность результатов и выводов. Эти ключевые вопросы варьировали в зависимости от типов исследований и применяемых вопросников, используемых для стандартизации процесса оценки публикаций. Была использована методология NICE (National Institute for Health and Care Excellence).

Для исключения влияния на процесс оценки субъективного фактора каждое исследование оценивалось независимо, по меньшей мере, двумя несвязанными членами рабочей группы. Какие-либо различия в оценках обсуждались группой в полной составе. Для достижения консенсуса привлекался независимый эксперт.

Методы, использованные для формулирования рекомендаций: консенсус экспертов.

Индикаторы доброкачественной практики (Good Practice Points – GPP): рекомендуемая доброкачественная практика базируется на практическом опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ

Выполнена оценка фактической экономической эффективности мониторинга устойчивости в комплексе с оценкой экономического ущерба от ИСМП новорожденных и родильниц.

Метод валидации рекомендаций: внешняя экспертная оценка; внутренняя экспертная оценка.

Описание метода валидации рекомендаций

Настоящие рекомендации в предварительной версии были рецензированы независимыми экспертами, которых попросили прокомментировать прежде всего то, насколько интерпретация доказательств доступна для понимания и порядок действий выполним в практике.

Получены комментарии со стороны врачей и среднего медицинского персонала многопрофильных и специализированных медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь детскому и взрослому населению, в отношении доходчивости изложения рекомендаций и их оценки важности рекомендаций, как рабочего инструмента повседневной практики.

Комментарии, полученные от экспертов, тщательно систематизировались и обсуждались членами рабочей группы.

Консультации и экспертная оценка

Настоящие рекомендации были представлены экспертам НАСКИ (Национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи), обсуждены и рекомендованы Профильной комиссией по эпидемиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации 14 апреля 2015 г., протокол № 5, г. Саранск

Рабочая группа

Для окончательной редакции и контроля качества рекомендации были повторно проанализированы членами рабочей группы, которые пришли к заключению, что все замечания и комментарии экспертов приняты во внимание, риск систематических ошибок при разработке рекомендаций сведен к минимуму, рекомендации не противоречат действующему санитарному законодательству.

Основные рекомендации

Сила рекомендаций (A-D) приводятся в таблице 3 и частично при изложении текста рекомендаций.

Таблица 3

Сила рекомендаций

Тип рекомендаций	Сила
Микроорганизмы, используемые при определении чувствительности к ДС	C
Питательные среды для культивирования микроорганизмов	B
Нейтрализаторы	C
Тест-объекты	D
Основные требования, предъявляемые при определении чувствительности микроорганизмов к ДС	C, GPP
Определение чувствительности микроорганизмов к ДС (вариант 1)	C, GPP
Определение чувствительности микроорганизмов к ДС (вариант 2)	C, GPP
Интерпретация результатов	C, GPP
Оценка методики	C

2. ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость бактерий к применяемым дезинфицирующим средствам (ДС) является одной из актуальных проблем здравоохранения, требующих решения, для предупреждения формирования и распространения резистентных штаммов [1, 4, 5, 11].

В медицинской литературе описаны случаи недостаточной эффективности применения ДС в отношении клинических штаммов микроорганизмов, вследствие чего патогенная и условно-патогенная микрофлора не только сохранялась длительное время на объектах внешней среды, но и накапливалась в готовых растворах дезинфектантов; отмечались случаи, когда контаминированные бактериями растворы послужили факторами передачи инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Это приводит к резкому снижению эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий и способствует поддержанию высокого уровня заболеваемости. В условиях роста заболеваемости ИСМП, их полиэтиологичности, большого адаптационного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, нарастания устойчивости к антимикробным препаратам назрела необходимость системного изучения устойчивости к дезинфицирующим средствам (ДС) микрофлоры медицинского учреждения и осуществления мониторинга этого показателя [5, 7, 8, 9, 11].

Изучение чувствительности (устойчивости) микробной флоры к ДС является одним из важнейших направлений эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинских учреждениях [4, 11]. Данное положение определено в СанПин 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», где в разделе II «Организация дезинфекционных и стерилизационных мероприятий» п. 1.9. указывается, что «в целях предупреждения возможного формирования резистентных к дезинфектантам штаммов микроорганизмов

следует проводить мониторинг устойчивости госпитальных штаммов с последующей их ротацией при необходимости» [3].

Разработка способа определения чувствительности бактерий к ДС вызвана необходимостью создания упрощенных методов определения чувствительности (устойчивости) микроорганизмов к дезинфицирующим средствам, доступных для проведения в бактериологических лабораториях медицинских организациях и ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии». Определение чувствительности (устойчивости) необходимо для оптимизации дезинфекционного режима и своевременной смены дезинфектантов на более эффективные в отношении резистентной микрофлоры (ротации ДС).

Данная методика запатентована: Патент на изобретение №2378363 Российская Федерация, «Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующему средству (варианты)». Авторы: Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Благонравова А.С., Ермольева С.А., Воробьева О.Н., Алексеева И.Г., Усачева С.Ю.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО НижГМА- №2008123115; заявл. 10.06.2008; зарег.10.01.2010, опубл. Бюл.№1 10.01.2010 [2].

«Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам» [2, б]:

- имеет целью оценку состояния чувствительности бактерий– возбудителей инфекций, выделенных от больных, носителей, из внешней среды, к различным дезинфицирующим средствам в применяемых режимах;
- основан на оценке роста бактерий на твердой питательной среде после экспозиции дезинфицирующего средства в заданном режиме; режим воздействия определяется методическими рекомендациями по применению дезинфицирующего средства;
- является количественным методом;

- имеет варианты определения чувствительности бактерий к дезинфицирующему средству при его применении в растворе или для обработки поверхности;

- позволяет выявлять состояние устойчивости бактерий к конкретному дезинфицирующему средству – состояние, при котором микроорганизм не погибает при воздействии данного средства в применяемом для дезинфекции режиме. Дезинфицирующее средство не оказывает на данный микроорганизм бактерицидного действия (в соответствии с принятыми критериями эффективности действия дезинфицирующего средства);

- позволяет оценивать степень чувствительности бактерии к дезинфицирующему средству; при наличии у микроорганизма состояния неполной чувствительности к дезинфицирующему средству оно оказывает на микроорганизм неполное бактерицидное действие или суббактерицидное действие;

- предназначен для применения в микробиологических лабораториях медицинских организаций, ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» в условиях рутинной практической деятельности;

- применяется для оценки состояния чувствительности к дезинфицирующим средствам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих различные инфекционные заболевания, включая и возбудителей ИСМП, кишечных инфекций, вспышечных штаммов; микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях, в том числе госпитальных штаммов;

- используется для осуществления мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам в медицинской организации как компонента эпидемиологического надзора за ИСМП;

- результаты, полученные при применении данной методики, могут использоваться для коррекции дезинфекционного режима;

обоснования ротации и выбора дезинфицирующих средств для профилактической и очаговой дезинфекции в медицинской организации; выбора средств для дезинфекции на других эпидемиологически значимых объектах и в домашних эпидемических очагах.

3. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Федеральный закон от 31.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".
2. СанПиН 2.1.3.2630-10. Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность.
3. Руководство Р 1.1.2.3.5.-10. "Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности".

4. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Ассоциированная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к дезинфицирующим средствам, относящимся к разным группам химических соединений по действующему веществу [9].

Комбинированная устойчивость микроорганизмов к антибактериальным средствам – одновременная устойчивость к различным антибактериальным средствам (дезинфектантам, антибиотикам, антисептикам и пр.) [9].

Мониторинг устойчивости бактерий к дезинфицирующим средствам - динамическая оценка состояния чувствительности патогенных и условно-патогенных бактерий, выделенных в медицинских организациях от пациентов, персонала и из различных объектов внешней среды, к дезинфицирующим средствам [5, 7, 8, 11].

Неполная чувствительность микроорганизмов к дезинфицирующим средствам – состояние, при котором под действием дезинфектанта в бактерицидном режиме (в концентрации и экспозиции, заявленных производителем как бактерицидные), наблюдается неполная гибель бактериальной культуры (рост от 1 до 299 КОЕ/мл) [6, 9]

Перекрестная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к различным дезинфектантам, относящимся к одной группе химических соединений на основе одного действующего вещества [9].

Приобретенная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (*Acquired Resistance*) – адаптация микроорганизмов к воздействию дезинфектанта, характеризующаяся формированием устойчивости к бактерицидным концентрациям одного или нескольких дезинфицирующих средств, к которым отсутствует исходная (природная) устойчивость [9, 12].

Сочетанная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к двум и более дезинфектантам из одной группы химических соединений, но с различными действующими веществами [9].

Чувствительность микроорганизмов к дезинфицирующим средствам – состояние микроорганизма, при котором под действием дезинфектанта в бактерицидном режиме (в концентрации и экспозиции, заявленных производителем как бактерицидные), наблюдается гибель 99,99-100% микробных клеток, подвергшихся воздействию. На практике состояние чувствительности оценивается по количеству выросших на чашке Петри колоний (отсутствие роста или рост от 1 до 299 КОЕ/мл) [6, 9].

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДВ	активно-действующее вещество
ИСМП	инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
ДВ	действующее вещество
ДС	дезинфицирующее средство
МИ	медицинские изделия
МО	медицинская организация
КОЕ	колониобразующая единица

6. МИКРООРГАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ

1. Клинические штаммы микроорганизмов разных таксономических групп: штаммы микроорганизмов, выделенные из клинического материала от пациентов и персонала; штаммы микроорганизмов, выделенные из смывов с объектов внешней среды.
2. Тест-штаммы микроорганизмов.

В соответствии с Российскими требованиями в качестве тест-штаммов для оценки бактерицидной активности применяются *Staphylococcus aureus* шт. 906, *Escherichia coli* шт. 1257; для оценки туберкулоцидной активности *Mycobacterium B5*; для оценки спороцидной активности: *Bacillus cereus* шт.96; для оценки фунгицидной активности: *Candida albicans* шт.15 (С).

В качестве тест-микроорганизмов также могут быть использованы штаммы, применяемые в соответствии с методами испытаний, утвержденными в Республике Беларусь, а также Европейскими требованиями: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15412, ATCC 15442, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Candida albicans* ATCC 10231 (С) [1].

7. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Выбор питательных сред, условий и сроков культивирования определяется видовыми особенностями исследуемых микроорганизмов **(В)**.

Для выращивания бактерий при их подготовке к определению чувствительности к дезинфицирующим средствам, применяются питательные среды и условия, оптимальные для культивирования микроорганизмов каждого вида / рода / группы.

При проведении исследований по оценке чувствительности бактерий к ДС высеив производится на плотные питательные среды общего назначения. Рекомендуется использовать агар Мюллера-Хинтона, если видовые особенности микроорганизма не требуют специальных питательных сред.

При оценке результатов исследования следует ориентироваться на сроки, необходимые для размножения и роста бактерий каждого вида, с учетом возможного бактериостатического воздействия ДС (удлинение лаг-фазы роста), что может вызвать необходимость более длительного культивирования **(В)**.

8. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ

В качестве тест-объектов используются любые виды поверхностей, в частности:

- клеенка
- пластик
- металл
- керамическая плитка
- деревянные поверхности, окрашенные краской
- резиновые объекты
- другие

Для оценки чувствительности бактерий к ДС, применяемым для дезинфекции поверхностей, в качестве тест-объектов выбираются материалы, типичные для обстановки МО (наиболее часто встречающиеся в качестве декоративно-отделочных и конструктивных материалов).

Поверхность тест-объекта расчерчивается на квадраты площадью 10x10 см², количество которых зависит от числа испытываемых штаммов. Тест-поверхности должны быть чистыми, неповрежденными, стерильными.

9. НЕЙТРАЛИЗАТОРЫ

Использование химических нейтрализаторов дезинфицирующих средств является обязательным. Растворы нейтрализаторов готовятся в асептических условиях, применяя только стерильную дистиллированную воду. При невозможности соблюдения асептических условий допускается стерилизация готовых растворов автоклавированием при 1,1 атм. (121°C) 15 минут

Для нейтрализации антимикробного действия ДС различных групп химических соединений применяют разные типы нейтрализаторов (Таблица 4).

Таблица 4

Нейтрализаторы, применяющиеся для нейтрализации антимикробного действия ДС различных групп химических соединений (С)

Действующее вещество ДС	Тип нейтрализатора	Приготовление
соединения хлора* соединения йода* соединения брома* кислород* перекись водорода и ее комплексы с солями* надуксусная кислота* озон*	0,5% - 1,0% раствор тиосульфата натрия	0,5 г. – 1,0 г. вещества на 100 мл дистиллированной воды

альдегид (глутаровый, ортофталевый, формальдегид, глиоксаль) фенол	универсальный нейтрализатор	твин-80 – 3,0 мл сапонин – 3,0 г. гистидин – 0,1 г. цистеин – 0,1 г. (довести фосфатно-буферным раствором до объема 100 мл)
	1,0% пиросульфит (метабисульфит)	1,0 г. вещества на 100 мл дистиллированной воды
четвертичные аммониевые соединения (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.) производные гуанидина (полигексаметиленгуанидин, хлоргексидина биглюконат и т.д.)	0,1% - 1,0% раствор сульфонола	0,1г. – 1,0 г. вещества на 100 мл дистиллированной воды
	универсальный нейтрализатор	см.выше
кислоты	любая щелочь в эквивалентной концентрации	готовить на дистиллированной воде
щелочи	любая кислота в эквивалентной концентрации	готовить на дистиллированной воде
спирты	дистиллированная вода	разбавление водой до не действующей концентрации
композиционные средства	универсальный нейтрализатор	см.выше
композиционные средства, содержащие вещества *	универсальный нейтрализатор + 0,5% тиосульфат натрия	твин-80 – 3,0 мл сапонин – 3,0 г. гистидин – 0,1 г. цистеин – 0,1 г. тиосульфат натрия - 0,5 г. (довести фосфатно-буферным раствором до объема 100 мл)
альдегидсодержащие средства композиционные средства	нейтрализующий бульон Ди-Ингли («HIMEDIA»)	готовый к применению

10. ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ

При проведении исследований чувствительности бактерий к ДС следует соблюдать следующие требования (С, GPP):

- исследования проводятся в условиях микробиологической лаборатории, имеющей разрешение на работы с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности;
- температура растворов испытываемых дезинфектантов должна быть в пределах от +18 до +20 °С (если по условиям исследования не рекомендована другая температура), независимо от температуры окружающей среды;
- при испытании ДС, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и др. использовать рабочие растворы только после полного растворения дезинфектанта;
- приготовление рабочих растворов ДС производить непосредственно перед проведением исследований; не допускается изучение чувствительности к рабочим растворам, приготовленным вне лаборатории (в отделениях ЛПУ);
- кратность постановки экспериментов должна быть не менее трех (при условии получения однотипных результатов); при получении неоднородных результатов – до получения однозначного ответа (три и более однотипных результата); при необходимости статистической обработки результатов – не менее восьми;
- все опыты должны сопровождаться контролями (перечислены в разделах, посвященных методике проведения исследований);
- тестируемые ДС до, во время и после испытаний должны храниться в соответствии с требованиями технических условий;
- при проведении исследований следует строго соблюдать меры индивидуальной защиты персонала (использование спецодежды, перчаток, средств защиты органов дыхания).

11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ В РАСТВОРЕ

I. Приготовление бактериальной взвеси.

1. Культуры микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде в течение 18 – 24 часов, смыть стерильным изотоническим раствором хлорида натрия.
2. Бактериальную суспензию каждого микроорганизма довести мутности, соответствующей концентрации 5×10^8 клеток/мл, что соответствует 5 единицам по стандарту мутности для оптической стандартизации бактерий (ГИСК им. Тарасевича Л.А.) или 1,5 единицам Мак-Фарланда (измерение денситометром согласно данным фирмы-изготовителя стандартов Мак-Фарланда bioMerieux) или теоретической оптической плотности 0,375 (концентрация BaSO_4 $7,2 \times 10^{-5}$ моль/л) (измерение денситометром при 550 нм).

II. Проведение исследования

1. Растворы дезинфектантов в рабочей концентрации (0,9 мл) разлить в стерильные пробирки с резиновыми пробками.
2. В пробирки с растворами дезинфектантов внести по 0,1 мл микробной взвеси и перемешать встряхиванием несколько секунд.
3. Экспозиция в течение времени, указанного в методических рекомендациях по применению ДС для данной концентрации при требуемом режиме обработки.
4. После действия дезинфектанта в указанной в методических рекомендациях по использованию препарата (или необходимой для эксперимента) экспозиции, внести по 0,5 мл раствора нейтрализатора и перемешать встряхиванием.
5. Посеять на плотную питательную среду по 0,1 мл смеси и поместить чашки с посевами в термостат.
6. Параллельно с проведением опыта поставить контроли:

- 1) Контроль жизнеспособности микроорганизма (посев микробной культуры на питательную среду);
- 2) Контроль стерильности раствора дезинфектанта без добавления культуры (посев приготовленного раствора дезинфектанта на питательную среду);
- 3) Контроль полноты нейтрализации дезинфектанта (1 - к раствору ДС добавляется нейтрализатор, 2 – в полученную смесь вносится микробная суспензия, 3 – выдерживается необходимая экспозиция, 4 – высев смеси на питательную среду);
- 4) При наличии устойчивости – контроль чувствительности тест-штаммов микроорганизмов к тестируемым ДС в бактерицидном режиме.

III. Учет результатов

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов данного вида, провести учет результатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. При отсутствии роста увеличивают сроки культивирования микроорганизмов в 2 раза (так, при сроках культивирования 24 ч., оставляют в термостате до 2-х суток).

Выросшие колонии подвергают микроскопии.

12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ ПРИ ДЕЗИНФЕКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ

I. Приготовление бактериальной взвеси

1. Культуры микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде в течение 18 – 24 часов, смыть стерильным изотоническим раствором хлорида натрия.
2. Бактериальную суспензию каждого микроорганизма довести мутности, соответствующей концентрации 5×10^8 клеток/мл, что соответствует 5 единицам по стандарту мутности для оптической стандартизации бакте-

рий (ГИСК им. Тарасевича Л.А.) или 1,5 единицам Мак-Фарланда (измерение денситометром согласно данным фирмы-изготовителя стандартов Мак-Фарланда bioMerieux) или теоретической оптической плотности 0,375 (концентрация BaSO_4 $7,2 \times 10^{-5}$ моль/л) (измерение денситометром при 550 нм).

II. Проведение исследования

1. На стерильную поверхность тест-объекта площадью $10 \times 10 \text{ см}^2$ дозатором нанести микробную взвесь в количестве 0,1 мл и распределить стерильным шпателем по всей площади квадрата.
2. После подсыхания микробной взвеси на поверхность мерно нанести 0,9 мл раствора дезинфектанта в рабочей концентрации и распределить по поверхности квадрата стерильным шпателем. Дезинфектант применять в концентрациях, указанных в методических рекомендациях по использованию средства (или необходимых для исследования).
3. Экспозиция в течение времени, указанного в методических рекомендациях по применению ДС для данной концентрации при требуемом режиме обработки (на отдельном столе в лабораторном боксе или в ламинарном боксе класса биологической защиты II А).
4. После воздействия дезинфектанта в требуемой экспозиции, на тест-объекты дозатором нанести по 0,5 мл раствора нейтрализатора и равномерно растереть по поверхности. Экспозиция нейтрализатора – 1- 3 секунды.
5. Смыть произвести сухим стерильным тампоном с поверхности тест-объекта.
6. Высев на чашки с плотной питательной средой произвести немедленно этим же тампоном (по 0,1 мл). Чашки с посевами помещаются в термостат.
7. Параллельно с проведением опыта ставят контроли:
 - 1) Контроль жизнеспособности микроорганизма (посев микробной культуры на питательную среду);

- 2) Контроль дезинфектанта без добавления культуры (посев приготовленного раствора дезинфектанта на питательную среду);
- 3) Контроль полноты нейтрализации дезинфектанта;
- 4) Контроль контаминации тест-объекта (после нанесения микробной взвеси на тест-поверхность произвести с нее смыв стерильным тампоном с последующим высевом на питательную среду);
- 5) Контроль стерильности тест-объекта (до нанесения микробной взвеси произвести смыв стерильным тампоном с тест-поверхности с последующим высевом на питательную среду).
- б) При наличии устойчивости – контроль чувствительности тест-штаммов микроорганизмов к тестируемым ДС в бактерицидном режиме.

III. Учет результатов

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов данного вида, провести учет результатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. При отсутствии роста увеличивают сроки культивирования микроорганизмов в 2 раза (так, при сроках культивирования 24 ч., оставляют в термостате до 2-х суток). Выросшие колонии подвергают микроскопии.

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка результатов изучения чувствительности микроорганизмов к ДС проводится в зависимости от назначения дезинфектанта (таблица 5).

1. При использовании ДС для обеззараживания поверхностей в помещениях, санитарно-технического оборудования, выделений

Штамм считать *чувствительным* при отсутствии роста или при росте не более 300 КОЕ/мл, что соответствует требуемой эффективности ДС (гибель 99,99% микроорганизмов).

При росте менее 300 КОЕ/мл штамм оценивать степень чувствительности:

1. полная чувствительность – при отсутствии роста;
2. неполная чувствительность – при наличии роста:
 - 100 – 299 КОЕ/мл – дезинфектант оказывает суббактерицидное действие;
 - от 1 до 99 КОЕ/мл – неполное бактерицидное действие

Штамм считать *устойчивым* к данному дезинфектанту в изучаемом режиме при росте 300 КОЕ/мл и более.

2. При использовании ДС для обеззараживания МИ, посуды, белья, одежды, обуви, игрушек, предметов ухода за больными

Штамм считать *чувствительным* при отсутствии роста микроорганизмов, что соответствует требуемой эффективности ДС (гибель 100% микроорганизмов).

Штамм считать *устойчивым* к данному дезинфектанту в изучаемом режиме при наличии роста микроорганизмов (1 КОЕ/мл и более).

Таблица 5

Интерпретация результатов изучения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (С, GPP).

Характеристика чувствительности к ДС	Назначение	
	обеззараживание поверхностей в помещениях, санитарно-технического оборудования, выделений	обеззараживание МИ, посуды, белья, одежды, обуви, игрушек, предметов ухода за больными
	Оценка роста микроорганизмов	
Устойчивый	рост 300 КОЕ/мл и более	Наличие роста (1 КОЕ/мл и более)
Чувствительный	от «роста нет» до 299 КОЕ/мл	Отсутствие роста («роста нет»)
Степени чувствительности*		
Полностью чувствительный (полное бактерицидное)	роста нет	-

действие ДС)		
Неполностью чувствительный (неполное бактерицидное действие ДС)	рост 1-99 КОЕ/мл	-
Неполностью чувствительный (суббактерицидное действие ДС)	рост 100-299 КОЕ/мл	-
Нормативные показатели эффективности дезинфекции	99,99%	100%

*Степени чувствительности оцениваются при использовании ДС для обеззараживания поверхностей в помещениях, санитарно-технического оборудования, выделений

14. ОЦЕНКА МЕТОДИКИ

Проведена оценка разработанной методики (вариантов – в растворе и на поверхности) по следующим стандартам:

- Чувствительность
- Специфичность
- Точность теста
- Положительное прогностическое значение
- Отрицательное прогностическое значение
- Воспроизводимость

В качестве методики сравнения («Золотого стандарта») использовались «Методы определения эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей в помещениях, санитарно-технического оборудования, транспортных средств, дорожных покрытий, других объектов окружающей среды, посуды, белья, одежды, выделений, изделий медицинского назначения, предметов ухода за больными, игрушек, антимикробных тканей, лаков, красок и др., обеззараживания воздуха» (М.Г. Шандала, Л.Г. Пантелеева, Н.Ф. Соколова и др.) [10]. Был проведен анализ результатов исследований 200 культур: оценка

устойчивости данных культур к дезинфицирующим средствам согласно разработанной методике и оценка эффективности дезинфицирующего средства в отношении этих же культур согласно «золотому стандарту», при действии дезинфицирующего средства в растворе и на поверхностях (С).

Таблица 6

Результаты оценки разработанной методики согласно общепринятым стандартам

Стандарты	Вариант 1 – в растворе	Вариант 2 – на поверхности
чувствительность	98,7 ± 1,2 %	97,6 ± 2,2 %
специфичность	99,2 ± 0,8 %	98,3 ± 1,6 %
точность теста	99 ± 0,9 %	98 ± 2 %
положительное прогностическое значение	98,7 ± 1,2 %	97,6 ± 2,2%
отрицательное прогностическое значение	99,2 ± 0,8 %	98,3 ± 1,6 %
воспроизводимость	95,4 ± 2,4 %	93,9 ± 3,6 %

Таким образом, при проведении исследований согласно предлагаемой методике, мы получаем достоверные результаты с высокой чувствительностью при опытах в растворе и на поверхности ($98,7 \pm 1,6\%$ и $97,6 \pm 2,2\%$ соответственно), высокой специфичностью ($99,2 \pm 1,2\%$ и $98,3 \pm 1,8\%$ соответственно) (табл. 6). Методика характеризуется также высокими значениями прогностичности (положительное прогностическое значение - $98,7 \pm 1,6\%$ и $97,6 \pm 2,2\%$ соответственно, отрицательное прогностическое значение - $99,2 \pm 1,2\%$ и $98,3 \pm 1,8\%$ соответственно), которые свидетельствуют о высокой вероятности наличия или отсутствия устойчивости у исследуемых культур при положительном или отрицательном результате постановки методики. Методика характеризуется высокими значениями воспроизводимости результатов исследований:

воспроизводимость результатов при исследованиях в растворе $95,4 \pm 2,4\%$; при исследованиях на различных тест-поверхностях - $93,9 \pm 3,6\%$.

Данная методика предназначена для использования при проведении мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам при эпидемиологическом надзоре за ИСМП, организованном в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «» на учрежденческом и региональном уровнях [5, 6]. Использование методики при проведении мониторинга позволяет оперативно и объективно оценить состояние чувствительности и распространенность устойчивости микроорганизмов к тестируемым дезинфицирующим средствам и применять адекватные меры по коррекции дезинфекционного режима, организации мониторинга, выбора и ротации дезинфицирующих средств [5, 6, 7, 8].

15. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств: временная инструкция. Утверждены заместителем министра здравоохранения, главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 24 декабря 1998г.
2. Патент на изобретение №2378363 Российская Федерация, «Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующему средству (варианты)». Авторы: Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Благодирова А.С., Ермольева С.А., Воробьева О.Н., Алексеева И.Г., Усачева С.Ю.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО НижГМА-№2008123115; заявл. 10.06.2008; зарег.10.01.2010, опубл. Бюл.№1 10.01.2010.
3. СанПин 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».
4. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и информационный материал по ее поло-

- жениям / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, А.В. Тутельян, И.В. Фельдбюм. - Н.Новгород: Издательство «Ремедиум Поволжье», 2012. - 84 с.
5. Мониторинг устойчивости бактерий к дезинфицирующим средствам к дезинфицирующим средствам в медицинских организациях. Федеральные клинические рекомендации. – М: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2014. – 62 с.
 6. Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / Шкарин В.В., Благоднравова А.С., Ковалишена О.В. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. - № 6. - С. 55-56.
 7. Проблемные вопросы мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / Благоднравова А.С., Ковалишена О.В. // Медицинский альманах. - 2013. - № 2 (26). - С. 103-107.
 8. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы / Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благоднравова А.С., Широкова И.Ю., Кулюкина А.А. // Медицинский альманах. - 2012. - № 3. - С. 122-125.
 9. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / Шкарин В.В., Благоднравова А.С., Ковалишена О.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2011. - № 3. - С. 48.
 10. Руководство Р 4.2. 26433-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». – М., 2010.
 11. Эпидемиологический надзор за внутрибольничными инфекциями: учебное пособие / В.В.Шкарин, О.В.Ковалишена, А.С.Благоднравова. –

Н.Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2009. – 124 с.

12. 28th plenary on 19 January 2009. Assesment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR):

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm.