

Методические указания МУ 3.5.1.4100-24 "Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 25 декабря 2024 г.)

Методические указания МУ 3.5.1.4100-24
"Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов,
циркулирующих в медицинских организациях"
(утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 25 декабря 2024 г.)

Дата введения - 25 апреля 2025 г.
Взамен МУ 3.5.1.3439-17



I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее - МУ) описывают алгоритм оценки чувствительности микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях (далее - МО), к дезинфицирующим средствам (далее - ДС), с помощью средств бактериологического и молекулярно-генетического анализа с целью выявления микроорганизмов, устойчивых к ДС, организации и проведения мероприятий по выбору и применению эффективных ДС для профилактики распространения инфекций, в том числе, связанных с оказанием медицинской помощи (далее - ИСМП).

1.2. МУ предназначены для специалистов органов и организаций, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), а также могут быть использованы специалистами органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья, медицинских, научно-исследовательских и образовательных организаций, бактериологических и ПЦР-лабораторий, аккредитованных в установленном порядке¹.

II. Общие положения

2.1. Микробиологический пейзаж внутрибольничной среды формируют более 300 бактерий, вирусов, грибов, простейших.

Длительная циркуляция микроорганизмов в больничной среде приводит к формированию измененных штаммов, характеризующихся не только устойчивостью к антибиотикам, но и к ДС.

2.2. Наиболее часто устойчивость формируется к ДС из группы катионных поверхностно-активных веществ (далее - КПАВ), включающей четвертичные аммониевые соединения (далее - ЧАС), производные гуанидина и третичные амины, которые относятся к числу наиболее часто используемых в МО. Основным механизмом формирования устойчивости микроорганизмов к КПАВ является снижение их внутриклеточной концентрации за счет активного выведения из клетки с помощью эффлюксных насосов. Молекулярно-генетическими маркерами устойчивости бактерий к КПАВ являются гены эффлюксных насосов группы *qac*.

2.3. Своевременное выявление микроорганизмов, устойчивых к ДС, средствами бактериологического и молекулярно-генетического анализа, разработка и реализация адекватных мер реагирования являются частью санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по предупреждению ИСМП.

2.4. Все работы с микроорганизмами проводятся в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями².

III. Организация мероприятий по оценке чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях

3.1. Мероприятия по оценке чувствительности к ДС микроорганизмов, циркулирующих в МО, осуществляются в рамках микробиологического мониторинга³ и включают:

- эпидемиологический надзор за уровнем и распространенностью ИСМП;
- микробиологическую диагностику ИСМП;
- санитарно-бактериологические исследования объектов внутрибольничной среды;
- оценку чувствительности микроорганизмов к ДС с помощью средств бактериологического и молекулярно-генетического анализа;
- организацию и проведение мер по повышению эффективности дезинфекционных мероприятий.

3.2. Эпидемиологический надзор за уровнем и распространенностью ИСМП осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴.

3.3. Микробиологическая диагностика ИСМП и санитарно-бактериологические исследования проводятся в лаборатории МО, при ее отсутствии могут привлекаться аккредитованные организации⁵.

3.4. Оценка чувствительности микроорганизмов к ДС проводится в соответствии с методами, изложенными в настоящих МУ.

3.5. Меры по повышению эффективности дезинфекционных мероприятий включают, например, ротацию ДС, использование ДС, обладающих иным механизмом действия на микробную клетку и (или) более широким спектром антимикробного действия по сравнению с ранее применяемыми.

3.6. Устойчивыми к ДС являются штаммы микроорганизмов, не погибающие от воздействия растворов ДС, примененных в режимах дезинфекции (концентрация, время воздействия (экспозиция), способ применения, норма расхода), указанных в инструкциях по их применению (далее - Инструкция).

3.7. Оценка чувствительности к ДС проводят в отношении микроорганизмов, циркулирующих в МО и обнаруженных на объектах окружающей среды, а также являющихся возбудителями ИСМП, в особенности, обуславливающих эпидемические очаги с множественными случаями заболеваний и летальности, применительно к тем ДС, которые используются в МО. Оценка чувствительности микроорганизмов к ДС проводят не реже одного раза в шесть месяцев по предварительно составленному графику или по эпидемиологическим показаниям⁶.

3.8. Для диагностики возбудителей ИСМП микроорганизмы выделяют от больных из патологических локусов, выделений, биологических жидкостей.

Для выявления микроорганизмов на объектах окружающей среды (например, медицинские изделия, поверхности столов, поручни кроватей, дверные ручки, посуда) отбираются смывы в палатах, операционных, перевязочных, манипуляционных, родовых залах, столовых и в других помещениях в соответствии с методическими документами⁷. Каждый последующий отбор проб целесообразно производить в одних и тех же точках.

3.9. Для оценки чувствительности микроорганизмов к ДС, в зависимости от поставленных задач и возможностей исследователей, могут применяться следующие методы:

а) основной метод с использованием тест-поверхностей из различных материалов или натуральных изделий, отражающий режим применения ДС в МО. Для исследования выбираются тест-объекты, которые имитируют те объекты внешней среды, с которых были взяты образцы;

б) упрощенный метод с использованием одной тест-поверхности в виде чашки Петри, также позволяющий моделировать режим применения ДС, но более ограниченно;

в) суспензионный микрометод на планшетах - простой, экономичный и не трудоемкий;

г) метод *in vitro* с использованием нейтрализующей питательной среды по Ди-Ингли;

д) молекулярно-генетический метод, позволяющий получить результат о наличии у микроорганизмов генетических маркеров устойчивости к КПАВ в течение 4 - 8 часов, в зависимости от метода выделения ДНК и с учетом постановки ПЦР.

Методы "в" - "д" используются для первичного отбора бактерий, потенциально устойчивых к ДС, при необходимости исследования большого количества микроорганизмов, а молекулярно-генетический метод - еще и для быстрого получения результата.

3.10. Обработка тест-объектов при использовании методов "а" и "б" проводится по режимам, указанным в Инструкции по применению конкретного ДС, соблюдая рекомендации: концентрацию,

время обеззараживания, способ обработки, норму расхода, температуру рабочего раствора, загрязненность объекта. При использовании методов "в" и "г" выбираются показатели (концентрация и время воздействия ДС), соответствующие режиму дезинфекции для определенной группы микроорганизмов (например, бактерицидному, фунгицидному, спороцидному).

3.11. Перед оценкой чувствительности микроорганизма к ДС проводится предварительная идентификация выделенного микроорганизма до вида любым доступным методом (например, изучение биохимических, антигенных, фаголитических и других свойств культуры, использование автоматических микробиологических анализаторов, времяпролетной масс-спектрометрии) и, при возможности, его тестирование на наличие молекулярно-генетических маркеров устойчивости к КПАВ методом полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) в режиме реального времени.

3.12. Исследования проводят в микробиологических лабораториях в боксированных помещениях или боксах микробиологической безопасности II класса ⁸.

IV. Методы оценки чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях

4.1. При оценке чувствительности к ДС микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях, применяются средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, реактивы и питательные среды, приведенные в таблицах 1 - 3.

Таблица 1

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Колбы мерные	2-го класса точности 2-100-2, 2-250-2, 2-1000-2 вместимость, ГОСТ 1770-74
Пипетки градуированные	2-го класса точности, вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 см ³ , ГОСТ 29227-91
Автоматические дозаторы одноканальные	Переменного объема 10 - 1000 мкл
Автоматические пипетки механические	8-канальные, переменного объема 20 - 200 и 10 - 100 мкл, ГОСТ 28311-2021
Цилиндры мерные	2-го класса точности, вместимостью 25 и 50 см ³ , ГОСТ 1770-74
Термометр лабораторный шкальный	Пределы измерения от 0 до 55°C
Примечание: допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.	

Таблица 2

Вспомогательное оборудование и материалы

Наименование вспомогательного оборудования и материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Бокс микробиологической безопасности	II класса, ГОСТ Р ЕН 12469-2010
Вытяжной шкаф	-
Шкаф сушильный	Поддерживающий температуру плюс (160 ± 5)°C
Термостаты	Поддерживающие рабочую температуру плюс (28 ± 2)°C и плюс (37 ± 2)°C
Автоклав электрический	ГОСТ 9586-75
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ Р ЕН 13060-2011, ГОСТ 31598-2012

Дистиллятор	-
Облучатель бактерицидный настенный	-
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678-85
Микроскоп биологический с иммерсионной системой	-
Амплификатор с детекцией в режиме реального времени	-
Твердотельный термостат с диапазоном температур от комнатной до 100°C	-
Настольная центрифуга для пробирок	Объемом 1,5 и 2,0 мл с ускорением до 13000 g, ГОСТ 31836-2012
Миницентрифуга-вортекс для пробирок	Объемом 0,2; 0,6; 1,5 и 2,0 мл
Магнитный штатив для пробирок	Объемом 1,5 и 2,0 мл
Планшеты культуральные полистироловые	96-луночные, 12-луночные
Пробирки оптически прозрачные	Вместимостью 0,2 мл
Планшеты 96-луночные полипропиленовые для ПЦР	-
Пленка для заклеивания 96-луночных планшетов для ПЦР	-
Наконечники для автоматических дозаторов с фильтрами	-
Микроцентрифужные пробирки	Объемом 1,5 и 2,0 мл
Лупа с увеличением x10	ГОСТ 25706-83
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932-90
Воронки конусные	Диаметром 40 - 45 мм, ГОСТ 25336-82
Груша резиновая	-
Петля бактериологическая	-
Марля медицинская	ГОСТ 9412-2021
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556-2022
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Тест-объекты из различных материалов	Размером 5x5 см
Медицинские тест-изделия (например, пинцеты, корнцанги, шпатели, резиновые трубки)	-
Штативы для пробирок	-
Марлевые салфетки	5 x 5 см
Оптический стандарт мутности N 20, N 10	-
Денситометр	-
Перчатки медицинские	ГОСТ Р 57397-2017
Биохимические системы идентификации микроорганизмов или бактериологические автоматизированные анализаторы	-
Примечание: допускается использование вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.	

Таблица 3

Реактивы и питательные среды

Наименование реактивов и питательных сред	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-90
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ Р 56389-2015
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233-77
Спирт этиловый технический	ГОСТ Р 55878-2013
Ацетон-спиртовая смесь 1:1	-
Водопроводная вода стерильная	-
Тиосульфат натрия	ГОСТ 27068-86
Твин-80	-
Гистидин	-
Цистеин	-
Сапонин	-
Сульфонол	-
Пиросульфит (метабисульфит) натрия	ГОСТ 11683-76
Инактивированная лошадиная сыворотка	-
Набор для окраски по Граму (раствор генциана фиолетового, раствор Люголя, раствор фуксина Циля)	-
Питательные среды для культивирования микроорганизмов, например, бульон и агар мясопептонный, ГРМ, ТС	ГОСТ ISO 11133-2016
Нейтрализующий бульон и агар по Ди-Ингли	-
Комплект реагентов для выделения ДНК	-
Готовые смеси для проведения ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентно-мечеными зондами	-
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	-
Праймеры и флуоресцентно-меченые зонды	-
Примечание: допускается использование других питательных сред и реактивов с аналогичными характеристиками.	

4.2. Подготовка культуры микроорганизма.

Микроорганизмы культивируют на следующих питательных средах:

- бактерии - на казеиновом бульоне, мясо-пептонном бульоне, казеиновом агаре, мясо-пептонном агаре или других питательных средах, предназначенных для культивирования определенных видов бактерий при температуре плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 - 24 ч;
- *M. tuberculosis*, нетуберкулезные микобактерии, выделенные от больных и из объектов непосредственно в данном учреждении - на среде Левенштейна-Йенсена, Финна 2 или аналогичной среде при температуре плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 7 - 28 суток;
- грибы рода *Candida* - на бульоне Сабуро, агаре Сабуро или аналогичных питательных средах при температуре плюс $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2 суток.

4.3. Приготовление микробной взвеси.

Для приготовления микробной взвеси культуру смывают с агара стерильной водопроводной водой или стерильным физиологическим раствором. Полученную взвесь фильтруют через стерильный ватно-марлевый фильтр и разводят стерильной водопроводной водой или стерильным физиологическим раствором до концентрации 2×10^9 клеток в 1 см^3 , соответствующей по мутности 20 единицам мутности отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-84 - 11 (20 МЕ) или 6,5 - 6,7 единицам по стандарту Мак-Фарланда, определяемым с помощью денситометра. Для контаминации

медицинских изделий готовят суспензию 1×10^9 клеток в 1 см^3 , соответствующей по мутности 10 единицам мутности отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-84 - 11 (10 МЕ) или 3,3 - 3,5 единицам по стандарту Мак-Фарланда.

4.4. Приготовление рабочих растворов ДС.

Рабочий раствор ДС готовят с соблюдением мер предосторожности в соответствии с рекомендациями, изложенными в Инструкции.

Если ДС представляет опасность при ингаляционном воздействии, растворы готовят в вытяжном шкафу или в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией, с защитой органов дыхания респираторами, кожи рук - влагонепроницаемыми перчатками, глаз - защитными очками.

4.5. Приготовление нейтрализатора.

Для нейтрализации действующего вещества (далее - ДВ), которое может быть перенесено с материалом тест-объекта при его посеве в питательную среду, используют нейтрализатор - вещество, которое устраняет (нейтрализует) действие химического агента на микробную клетку, но не убивает и не задерживает рост тест-микроорганизма. В качестве нейтрализаторов для ДВ из различных химических групп применяют⁹:

- для галоидоактивных (хлор-, бром- и йодактивные) и кислородактивных (перекись водорода, ее комплексы с солями, надуксусная кислота, озон) - 0,1 - 1,0% растворы тиосульфата натрия;

- для четвертичных аммониевых солей (например, алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид), аминов, производных гуанидина (например, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат) - универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3 - 3,0%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%);

- для альдегидов (глутаровый альдегид, глиоксаль, формальдегид, ортофталевый альдегид) - 1,0% раствор пиросульфита (метабисульфита) натрия или универсальный нейтрализатор (см. выше);

- для кислот - щелочи в эквивалентном количестве;

- для щелочей - кислоты в эквивалентном количестве;

- для спиртов - вода;

- для композиционных средств - универсальный нейтрализатор (см. выше). Если в состав средства входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия (0,1 - 1,0%).

Как альтернатива универсальному нейтрализатору может быть использован нейтрализующий питательный бульон или агар по Ди-Ингли.

Приготовление и стерилизацию указанных питательных сред осуществляют в соответствии с Инструкцией.

4.6. Выбор тест-объекта, используемого для оценки чувствительности выделенного штамма микроорганизма.

Выбор тест-объекта зависит от назначения ДС. При определении чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС, предназначенному для обеззараживания поверхностей в помещениях, в качестве тест-объекта используют различные материалы, например, линолеум, кафельную плитку, пластик, стекло, фаянс (не менее 3 видов).

При определении чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС, предназначенному для обеззараживания медицинских изделий, в качестве тест-объектов используют материалы, из которых изготовлены изделия (стекло, металлы, пластмассы, резины).

При определении чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС универсального назначения выбирают для оценки чувствительности режимы обеззараживания объектов разными способами: способом протирания (например, поверхности) и погружения (например, медицинские изделия).

При использовании для оценки чувствительности упрощенного метода в качестве тест-объекта используют чашку Петри из стекла или пластика. При выборе методов "в" и "г" исследования проводят на полистироловых планшетах.

4.7. Оценка чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС, предназначенным для обеззараживания поверхностей.

При проведении исследований используют тест-объекты размером 5x5 см из различных материалов, но не менее 3 видов.

В качестве тест-микроорганизма используют микроорганизм, выделенный от больного или с

поверхности объекта внутрибольничной среды. Эксперимент проводят после идентификации микроорганизма и проверки чистоты культуры.

Тест-объекты перед контаминацией микроорганизмом подвергают механической очистке - моют водой с мылом и щеткой, затем высушивают при комнатной температуре и автоклавируют. При использовании тест-объектов, не устойчивых к автоклавированию, допускается их обработка фламбированием с помощью смоченного в спирте горящего ватного тампона.

Тест-объект помещают на дно стерильной чашки Петри и располагают на лабораторном столе в микробиологическом боксе или боксах микробиологической безопасности II класса на поддонах с салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором. Пипеткой наносят на них 0,1 см³ микробной взвеси с концентрацией 2×10^9 клеток в 1 см³ (площадь поверхности 25 см²), равномерно распределяют ее по поверхности стерильным шпателем, не допуская стекания суспензии за пределы тест-объекта, затем подсушивают, приоткрыв чашку Петри (до полного высыхания) при температуре плюс 18 - 22°C и относительной влажности 40 - 60%, после чего обрабатывают раствором ДС.

Обработку тест-объектов раствором ДС проводят способами протирания или орошения (в зависимости от рекомендаций, изложенных в Инструкции).

При обработке способом протирания перед нанесением ДС на контаминированный тест-объект помещают стерильную марлевую салфетку размером 5x5 см для предотвращения стекания ДС, затем наносят ДС с помощью пипетки и протирают тест-объект этой салфеткой. При обработке способом орошения дезинфицирующий раствор наносят с помощью распылителя с дозатором. Количество наносимого дезинфицирующего раствора зависит от рекомендуемой нормы расхода, указанной в инструкции по применению средства: например, если норма расхода составляет 100 мл/м², то на объект размером 5x5 см наносят 0,25 см³ средства.

После окончания экспозиции чашки с тест-объектами заливают 10 см³ раствора нейтрализатора, соответствующего данному ДС, и делают несколько круговых движений чашкой для лучшего смачивания тест-объекта. Через несколько минут стерильным пинцетом переворачивают тест-объект и повторяют круговые движения. После контакта нейтрализатора с тест-объектом в течение 10 мин снова делают несколько круговых движений чашкой, затем стерильным пинцетом удаляют тест-объект из чашки и сбрасывают его в емкость с дезинфицирующим раствором с целью дальнейшего обеззараживания.

Нейтрализатор из чашки Петри засевают (на 2 - 3 чашки по 0,1 - 0,2 см³ в каждую) на твердые дифференциально-диагностические питательные среды либо заливают чашку с нейтрализатором растопленным и остуженным до температуры плюс 45°C агаром. После застывания агара посеvy помещают в термостат и культивируют при оптимальной температуре, необходимой для роста данного микроорганизма: для бактерий - при плюс (37 ± 1)°C до 48 ч; для микобактерий - при плюс (37 ± 1)°C в течение 21 суток; для грибов рода *Candida* - при плюс (27 ± 1)°C до 10 суток. Более длительные сроки культивирования микроорганизмов после воздействия растворов ДС рекомендуются для лучшего восстановления их жизнеспособности и снятия бактериостатического действия.

Контрольные тест-объекты обрабатывают так же, как и опытные, используя вместо ДС стерильную водопроводную воду.

Учет результатов проводят путем оценки остаточной обсемененности поверхностей после обработки раствором ДС в выбранном режиме. После подсчета количества выросших на чашках Петри колоний рассчитывают плотность контаминации 25 см² поверхности и эффективность обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%. Эффективность обеззараживания рассчитывают по формуле (1):

$$X = 100 - \frac{O_n}{K} \cdot 100, (1)$$

где: X - эффективность обеззараживания;

Oп - количество микробных клеток на опытной поверхности;

K - количество микробных клеток на контрольной поверхности.

Пример расчета. С 25 см^2 контрольной поверхности снято 148000 микробных клеток, а с аналогичного вида опытной поверхности - 20 микробных клеток. Эффективность обеззараживания при этом: $100 - (20/148000 \times 100) = 99,986\%$.

Если гибель микроорганизма на обработанных поверхностях составляет 99,99% и более, выделенный госпитальный штамм считают чувствительным к действию ДС, если менее 99,99% - считают устойчивым к данному ДС в исследуемом режиме применения.

Исходя из полученных результатов, выдают рекомендации по дальнейшему использованию ДС для дезинфекции в МО:

- при установлении чувствительности госпитального штамма микроорганизма к действию ДС в каком-либо из рекомендованных в инструкции по применению средства режимов, средство в данном режиме (режимах) можно применять для обеззараживания поверхностей;

- в том случае, когда установлена устойчивость госпитального штамма микроорганизма к действию ДС в испытанном режиме применения, данное ДС рекомендуется заменить на другое, эффективное в отношении данного штамма.

4.8. Оценка чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС, предназначенным для обеззараживания медицинских изделий.

В качестве тест-изделий используют стерильные медицинские изделия из различных материалов (металл, резина, пластмасса, стекло). Перечень медицинских изделий из металлов, взятых в эксперимент, включает инструменты, имеющие (например, корнцанг) и не имеющие замковых частей (например, пинцеты, шпатели).

В качестве тест-микроорганизма используют выделенный от больного или из объектов внутрибольничной среды штамм микроорганизма.

Изделия размещают в лотке (на поддоне) на лабораторном столе микробиологического бокса или бокса микробиологической безопасности II класса.

На поверхность тест-изделия (у замковых медицинских изделий - в область замка, а при наличии каналов и полостей - также в канал изделия) с помощью пипетки наносят по $0,1 \text{ см}^3$ суспензии тест-микроорганизмов с концентрацией 1×10^9 клеток в 1 см^3 , содержащей 40% инактивированной лошадиной сыворотки, для имитации органического загрязнения. Тест-изделия подсушивают до полного высыхания при температуре плюс 18 - 22°C и относительной влажности 40 - 60%. Мелкие тест-изделия погружают в указанную взвесь тест-микроорганизма на 15 мин, затем их извлекают и подсушивают при тех же условиях (до полного высыхания). При испытании ДС, обладающих фиксирующими свойствами, количество добавляемой сыворотки составляет не 40, а 5%, так как в Инструкциях к таким средствам в практических условиях рекомендуется перед дезинфекцией предварительно отмывать изделия от органических загрязнений.

Дезинфицирующие растворы готовят на стерильной водопроводной воде. После подсушивания контаминированные изделия полностью погружают в раствор испытываемого ДС, заполняя им все каналы и полости изделий, избегая образования воздушных пробок. Инструменты, имеющие замковые части, погружают раскрытыми, предварительно сделав ими в растворе ДС несколько рабочих движений для лучшего проникновения раствора в труднодоступные участки изделий в области замка. Толщина слоя раствора ДС над изделиями должна быть не менее 1 см. Параллельно для контроля изделия погружают в стерильную водопроводную воду.

После окончания дезинфекционной выдержки изделия извлекают из дезинфицирующего раствора и марлевой салфеткой размером 5x5 см, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, затем салфетку помещают в пробирку с 10 см^3 того же нейтрализатора и встряхивают с бусами в течение 5 - 10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора. Для оценки эффективности обеззараживания смывную жидкость с поверхности изделия и из канала засевают на соответствующие питательные среды. Мелкие изделия погружают в раствор нейтрализатора на 5 мин, а затем изделия переносят в пробирки с жидкой питательной средой.

Посевы выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста тестируемого микроорганизма: для бактерий - при плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ до 48 ч; для микобактерий - при плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 21 суток; для грибов рода *Candida* - при плюс $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ до 10 суток. Более длительные сроки культивирования микроорганизмов после воздействия растворов ДС рекомендуются для лучшего восстановления их жизнеспособности и снятия бактериостатического действия.

Учет результатов проводят после инкубации посевов в термостате, отмечая наличие или отсутствие роста микроорганизма на питательных средах.

Если гибель тестируемого микроорганизма на изделиях составляет 100% (отсутствие роста во всех пробах), выделенный госпитальный штамм микроорганизма считают чувствительным к действию ДС, если менее 100% (наличие роста в одной или более пробах) - считают устойчивым к данному ДС в исследуемом режиме применения.

Исходя из полученных результатов даются рекомендации по дальнейшему использованию ДС для дезинфекции в МО:

- при установлении чувствительности госпитального штамма микроорганизма к действию ДС в каком-либо из рекомендованных в Инструкции режимов, средство в данном режиме (режимах) можно применять для обеззараживания медицинских изделий;

- в том случае, когда установлена устойчивость госпитального штамма микроорганизма к действию исследованного режима применения ДС, средство рекомендуется заменить на другое, эффективное в отношении данного штамма.

4.9. Упрощенный метод оценки чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам.

В качестве тест-объекта вместо стеклянных или пластиковых поверхностей используют чашки Петри, изготовленные либо из стекла, либо из пластика. Если средство предназначено для дезинфекции поверхностей или посуды, то на внутреннюю поверхность чашки Петри площадью, например, 80 см^2 дозатором (пипеткой) наносят $0,4 \text{ см}^3$ суспензии микроорганизма с концентрацией 2×10^9 клеток в 1 см^3 и равномерно распределяют ее по поверхности стерильным шпателем. Если ДС предназначено для дезинфекции медицинских изделий или предметов ухода за больными, то на поверхность чашки наносят $0,1 \text{ см}^3$ суспензии микроорганизмов с концентрацией 1×10^9 клеток в 1 см^3 с добавлением 40% инактивированной лошадиной сыворотки. После подсушивания обработку зараженной поверхности чашки проводят по режиму и способу, рекомендованному в Инструкции - (орошение, протирание или погружение), соблюдая режим и рекомендованные нормы расхода соответственно выбранному способу обработки. После окончания дезинфекционной выдержки чашку заливают 8 см^3 раствора нейтрализатора, соответствующего данному ДС и делают несколько круговых движений чашкой для лучшего смачивания ее поверхности. Через определенную временную выдержку, необходимую для действия нейтрализатора, например, 10 мин, жидкость заливают растопленным и остуженным до 45°C агаром. Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста тестируемого микроорганизма, после чего проводят учет результатов.

Анализ результатов проводят путем сравнения количества колониеобразующих единиц (КОЕ), выросших на опытной чашке, в сравнении с контрольной, контаминированной аналогично опытной и обработанной стерильной водопроводной водой. Критерий эффективности - снижение микробной обсемененности не менее чем на 99,99% (при оценке эффективности обеззараживания поверхностей) и не менее 100% (при оценке эффективности обеззараживания медицинских изделий, посуды, предметов ухода за больными).

4.10. Оценка чувствительности микроорганизмов к ДС *in vitro* суспензионным микрометодом.

В исследованиях используют стерильные 96-луночные планшеты и автоматические дозаторы со стерильными наконечниками.

Подготовку рабочего раствора ДС, нейтрализатора, культуры микроорганизма проводят в соответствии с п.п. 4.2 - 4.5.

В первую лунку планшета вносят $0,18 \text{ см}^3$ раствора ДС в минимальной бактерицидной концентрации, указанной в Инструкции. Во вторую лунку вносят раствор нейтрализатора, в третью лунку - стерильную водопроводную воду в таком же количестве.

Затем в первую лунку, содержащую раствор ДС, вносят $0,02 \text{ см}^3$ суспензии микроорганизма с концентрацией 1×10^9 клеток в 1 см^3 и тщательно перемешивают содержимое пипетированием. Выдерживают экспозицию, указанную в Инструкции для данной концентрации.

По истечении времени воздействия ДС с помощью дозатора $0,02 \text{ см}^3$ содержимого из первой лунки переносят в лунку с нейтрализатором и тщательно перемешивают, выдерживают 10 мин, после чего $0,02 \text{ см}^3$ переносят в третью лунку со стерильной водопроводной водой. Выдерживают 10 мин и далее делают высевы по $0,1 \text{ см}^3$ содержимого в стерильную пробирку с 5 см^3 жидкой

питательной среды и чашку Петри с плотной питательной средой.

Инкубируют посе́вы в термостате при температуре плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на плотной питательной среде: бактерии - 24 - 48 ч, грибы - 7 суток, на жидкой питательной среде - 7 суток.

Оценивают результаты опыта по наличию или отсутствию роста микроорганизмов в жидкой и на плотной питательных средах: на плотной среде подсчитывают количество выросших колоний, проводят сравнение с контролем, которым является посев микроорганизмов в питательную среду без обработки ДС. Наличие роста на жидкой питательной среде определяют по изменению ее внешнего вида в сравнении с контролем.

Результаты исследований регистрируют в рабочем журнале и оформляют в виде протокола.

Чувствительным микроорганизмом считают тот, который погибает от воздействия выбранной концентрации ДС в трех повторностях эксперимента при наличии типичного роста тест-культуры в контроле.

4.11. Определение чувствительности микроорганизмов к ДС *in vitro* с использованием нейтрализующей питательной среды по Ди-Ингли.

В исследовании используются 12-луночные стерильные планшеты. Подготовку рабочего раствора ДС, нейтрализатора, культуры микроорганизма проводят в соответствии с п.п. 4.2 - 4.5.

С помощью стерильной пипетки в лунки 12-луночного планшета вносят по $0,1 \text{ см}^3$ микробной взвеси с концентрацией 1×10^9 клеток в 1 см^3 . Далее подсушивают взвесь микроорганизмов на внутренней поверхности лунки в течение 45 - 60 мин при комнатной температуре плюс $(22,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ и влажности помещения 40 - 60%. После подсушивания в лунки первых двух рядов - А и В (опытные лунки) стерильной пипеткой вносят по $0,5 \text{ см}^3$ рабочего раствора исследуемого ДС в соответствии с Инструкцией, после чего выдерживают время экспозиции, согласно испытываемому режиму дезинфекции. В лунки третьего ряда - С (контрольные лунки) вносят по $0,5 \text{ см}^3$ стерильной водопроводной воды. По истечении времени экспозиции во все лунки планшета, включая третий, нижний ряд - С (контрольные лунки), стерильной пипеткой вносят по 5 см^3 нейтрализующего бульона по Ди-Ингли или растопленного и остуженного до 45°C агара по Ди-Ингли. Затем 12-луночный планшет с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре плюс $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 - 48 ч на плотной питательной среде и до 7 суток на жидкой питательной среде.

Результаты оценивают по наличию или отсутствию роста микроорганизмов в жидкой и на плотной питательной средах. Сравнение проводят с контролем, которым являются посе́вы тест-микроорганизмов в лунках ряда С без обработки ДС.

Чувствительными считают микроорганизмы при отсутствии характерного роста микроорганизмов в опытных лунках в трижды повторенном опыте и наличии характерного роста в контрольных лунках. Устойчивыми считают микроорганизмы при наличии характерного роста в опытных и в контрольных лунках в трижды повторенном опыте.

4.12. Метод выявления молекулярно-генетических маркеров устойчивости бактерий к КПАВ у микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях.

Работы по проведению исследований методом ПЦР осуществляют в соответствии с методическими документами¹⁰. Утилизацию исходных субстратов и отходов проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹¹, а также методическими документами¹².

Выделение нуклеиновых кислот из бактериальной культуры проводят в соответствии с инструкцией по применению выбранного набора реагентов. Очищенную ДНК хранят в течение недели при температуре плюс 2 - 8°C и в течение 1 года при температуре не выше минус 16°C .

Подготавливают и маркируют необходимое количество пробирок с оптически-прозрачной плоской крышкой вместимостью $0,2 \text{ см}^3$ или планшет для ПЦР. Размораживают реагенты из используемого набора для проведения ПЦР с флуоресцентно-мечеными зондами и приготавливают реакционную смесь в соответствии с инструкцией к набору из расчета $0,025 \text{ см}^3$ смеси на один образец ДНК. Добавляют к реакционной смеси праймеры и зонд для определенного гена семейства *qac* и гена 16S рРНК (внутренний контроль амплификации) до конечной концентрации $0,5 \text{ мкМ}$ для каждого праймера и $0,25 \text{ мкМ}$ для каждого зонда. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для каждого гена указаны в таблице 4.

Содержимое пробирки с реакционной смесью тщательно перемешивают и центрифугируют

в течение 3 - 5 сек на микроцентрифуге-вортексе, после чего переносят по 0,020 см³ реакционной смеси в пробирки или планшеты для ПЦР и добавляют по 0,005 см³ образца ДНК в каждую из них. В пробирку отрицательного контроля добавляют 0,005 см³ деионизированной воды, свободной от нуклеаз. Пробирки закрывают, тщательно перемешивают содержимое и центрифугируют в течение 3 - 5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 4

Последовательности праймеров и зондов

N	Гены	Последовательности праймеров и зондов
Грамотрицательные бактерии		
1	qacE/ЕΔ1	D: 5' - CAATAGTTGGCGAAGTAATC - 3' R: 5' - TGGCTGTAATTATGACGACG - 3' Зонд: 5' - FAM - ATCCATCCCTGTCTGGTGT - BHQ1
2	qacF/L/H	D: 5' - GTTGTAGTTGTGGCTGGCT - 3' R: 5' - ATGTGCGCTGACCTTGGAT - 3' Зонд: 5' - ROX - CGGGCTTGGCTTCTATTTC - BHQ2
3	qacG	D: 5' - TAGTACCGTCTTTTATCGTCGT - 3' R: 5' - CCGACCAAAGTGCCTAGGCG - 3' Зонд: 5' - HEX - TACGCTGCTGCTTTTATTTC - BHQ1
Грамположительные бактерии		
4	qacA/B	D: 5' - CTGGCTTATACCTATTACCTA - 3' R: 5' - TCCAACTAAAATTAATGCTAAAG - 3' Зонд: 5' - HEX - CGATTTGGACCGAAAATAGTGTTAC - BHQ1
5	qacC (smr)	D: 5' - AGTAAAACAATGCAACACCTAC - 3' R: 5' - АТАСТАГАТТАТТАГАТТТАТТТГ - 3' Зонд: 5' - FAM - TTAGTCTTAACAACCGTAGTCTCAAT - BHQ1
6	qacG	D: 5' - CAATAATCTCAGTTATCGTTTAAAA - 3' R: 5' - CTTTCTCCAAATACATTTAAGAG - 3' Зонд: 5' - FAM - CATTGGCTTAATTGTTATAGGTGTAGT - BHQ1
7	qacH	D: 5' - CCAACTATAACAACAATCATTTCA - 3' R: 5' - AACCTGMCCAAGTTGCGTAAG - 3' Зонд: 5' - HEX - AGTAAAAGTATGCAACATTTACCACTTA - BHQ1
8	qacJ	D: 5' - AATAATAGGAAGTAGTTTCTTAAA - 3' R: 5' - TAAATATTTTCATAGTTACACTTAAA - 3' Зонд: 5' - ROX - AGCAGAAGGRTTACAAAAGTTTGGC - BHQ2
Внутренний контроль амплификации		
9	16S рPHK	D: 5' - CAGCAGCCGCGGTAATAC - 3' R: 5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3' Зонд: 5' - Cy5-5' - TGTAGCGGTGAAATGCG - BHQ2'

Пробирки с реакционной смесью переносят в амплификатор с детекцией в режиме реального времени. Амплификацию проводят с учетом рекомендаций к используемому набору реактивов для ПЦР (таблица 5).

Таблица 5

Параметры программы амплификации

95°C	2 мин*	1 цикл
95°C	15 сек	38 циклов
56°C	20 сек	

	(считывание сигнала)	
72°C*	20 сек	
Примечание: * с учетом рекомендации к набору реактивов для ПЦР.		

Используют 2 канала детекции для каждого образца ДНК - FAM и Cy5, HEX и Cy5 или ROX и Cy5, в зависимости от выявляемого гена семейства qac (см. таблицу 4). Результаты тестирования интерпретируют согласно таблице 6.

Таблица 6

Интерпретация результатов ПЦР

Образец	Значения Ct (порогового цикла ПЦР)		Интерпретация
	Каналы FAM, HEX, ROX	Канал Cy5	
Отрицательный контроль	нет значения или Ct > 30	нет значения или Ct > 30	Специфическая контаминация отсутствует
	Ct < 30	Ct < 30	Специфическая контаминация. Требуется повтор анализа или замена реактивов
Исследуемый образец	Ct < 30	Ct < 30	Присутствие соответствующего гена
	нет значения или Ct > 30	Ct < 30	Отсутствие соответствующего гена
	нет значения или Ct > 30	нет значения или Ct > 30	Недостаточное количество ДНК или ингибирование реакции. Требуется повтор анализа данного образца, начиная с этапа выделения ДНК

Госпитальные штаммы, у которых были обнаружены гены семейства qac, рассматриваются как потенциально устойчивые к КПАВ, что рекомендуется подтверждать результатами оценки их чувствительности к ДС с помощью бактериологического анализа.

V. Оформление результатов исследований

5.1. Результаты оценки чувствительности выделенного штамма микроорганизма к действию ДС рекомендуется оформлять в виде протокола, в котором целесообразно указывать следующие положения:

- название организации, проводившей оценку устойчивости;
- название выделенного штамма микроорганизма;
- дата выделения штамма микроорганизма;
- источник (объект) и место выделения;
- объект исследования;
- название ДС, к которому определялась устойчивость;
- методика исследований;
- исследованный режим применения (концентрация ДС, экспозиция, норма расхода, способ обработки);
- результат оценки эффективности обеззараживания;
- дата проведения исследований.

ДС, к которому выявлена устойчивость микроорганизма, заменяется на другое, отличающееся по химическому составу ДВ, после подтверждения чувствительности к нему

исследуемого штамма микроорганизма.

При возникновении трудностей по подбору эффективного ДС или других проблем по оценке чувствительности, выделенный устойчивый штамм микроорганизма, образец ДС в количестве одной упаковки коммерческого препарата, к которому выявлена устойчивость выделенного штамма, а также результаты оценки чувствительности штамма микроорганизма к ДС, рекомендуется передать во Всероссийский научно-методический центр по неспецифической профилактике инфекционных болезней и мониторингу устойчивости биологических агентов к дезинфекционным средствам на базе Института дезинфектологии ФБУН "ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана" Роспотребнадзора¹³.

Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".
2. Федеральный закон от 28.12.2013 N 412-ФЗ "Об аккредитации в национальной системе аккредитации".
3. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".
4. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".
5. Приказ Роспотребнадзора от 20.01.2014 N 34 "О создании Всероссийского научно-методического центра по неспецифической профилактике инфекционных болезней и мониторингу устойчивости биологических агентов к дезинфекционным средствам".
6. Р 4.2.3676-20 "Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности".
7. МУК 4.2.2942-11 "Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях".
8. МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности".
9. МР 2.1.0246-21 "Методические рекомендации по обеспечению санитарно-эпидемиологических требований к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".
10. МР 3.1.0346-24 "Организация и проведение микробиологического мониторинга в медицинских организациях".
11. ГОСТ Р 56994-16 "Дезинфектология и дезинфекционная деятельность. Термины и определения".
12. ГОСТ Р 56990-2016 "Химические дезинфицирующие средства и антисептики. Критерии и показатели эффективности".
13. ГОСТ Р 58151-2018 "Дезинфицирующие средства. Методы определения показателей эффективности".
14. ГОСТ Р 59072-2020 "Средства дезинфицирующие. Суспензионный метод определения антимикробной активности".
15. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Справочная информация

В настоящих МУ используются следующие термины и определения:

Действующее вещество (ДВ) - химические и (или) биологические вещества, входящие в состав дезинфекционных средств, обеспечивающих целевую эффективность¹⁴.

Дезинфицирующие средства (ДС) - средства, применяемые для снижения до приемлемого уровня или уничтожения микроорганизмов в/на объектах окружающей среды¹⁵.

Нейтрализатор дезинфицирующего средства - вещество (смесь веществ), прекращающее действие дезинфицирующего средства¹⁶.

Устойчивость - сопротивляемость организма (популяции, биоценоза) к воздействию различных факторов (яды, загрязнители, паразиты, болезни). В дезинфектологии - приобретенная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам¹⁷.

¹ Федеральный закон от 28.12.2013 N 412-ФЗ "Об аккредитации в национальной системе аккредитации".

² Глава IV СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62500), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 N 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный N 67587); от 25.05.2022 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный N 68934) (далее - СанПиН 3.3686-21).

³ Пункт 3529 главы XLIV СанПиН 3.3686-21; МР 3.1.0346-24 "Организация и проведение микробиологического мониторинга в медицинских организациях", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 26.04.2024.

⁴ Пункт 3517 СанПиН 3.3686-21.

⁵ Пункт 3530 СанПиН 3.3686-21.

⁶ Пункт 3533 СанПиН 3.3686-21.

⁷ МУК 4.2.2942-11 "Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 15.07.2011.

⁸ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

⁹ Пункт 3.1.6 Р 4.2.3676-20 "Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности", утвержденного руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.12.2020.

¹⁰ МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009.

¹¹ Глава X СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 3 (зарегистрировано Минюстом России 29.01.2021, регистрационный N 62297), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.06.2021 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 07.07.2021, регистрационный N 64146), от 14.12.2021 N 37 (зарегистрировано Минюстом России 30.12.2021, регистрационный N 66692), от 14.02.2022 N 6 (зарегистрировано Минюстом России 17.02.2022, регистрационный N 67331).

¹² МР 2.1.0246-21 "Методические рекомендации по обеспечению санитарно-эпидемиологических требований к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 17.05.2021.

¹³ Приказ Роспотребнадзора от 20.01.2014 N 34 "О создании Всероссийского научно-методического центра по неспецифической профилактике инфекционных болезней и мониторингу устойчивости биологических агентов к дезинфекционным средствам".

¹⁴ ГОСТ Р 58151.2-2018 "Средства дезинфицирующие. Номенклатура показателей токсичности и безопасности", введенный приказом Росстандарта от 05.06.2018 N 315-ст (далее - ГОСТ Р 58151.2-2018).

¹⁵ ГОСТ Р 58151.2-2018.

¹⁶ ГОСТ Р 56994-2016 "Дезинфектология и дезинфекционная деятельность. Термины и определения", введенный приказом Росстандарта от 30.06.2016 N 748-ст (далее - ГОСТ Р 56994-2016).

¹⁷ ГОСТ Р 56994-2016.

Утверждено

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

5 декабря 2024 г.

А.Ю. Попова