


# Способы определения резистентности к дезинфицирующим средствам

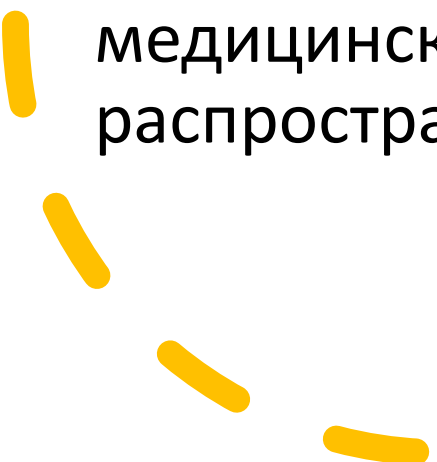
Ильякова Анастасия Васильевна

Научный сотрудник лаборатории проблем дезинфекции  
ФБУН НИИДезинфектологии Роспотребнадзора



Устойчивость микроорганизмов к применяемым дезинфицирующим средствам является одной из актуальных проблем на этапе современного развития здравоохранения, требующей решения, для предупреждения формирования и распространения резистентных штаммов

Оценке устойчивости бактерий к дезинфицирующим средствам уделяется все больше внимания, что связано с необходимостью своевременной коррекции дезинфекционного режима в медицинских организациях для предупреждения формирования и распространения госпитальных штаммов



# История вопроса

---

Устойчивость к дезинфектантам, антисептикам, консервантам впервые была описана L.S.Heathman с соавторами на примере резистентных к хлорсодержащим веществам штаммов *Salmonella typhi* и *Enterobacter aerogenes* в 1936 г. Многочисленные сообщения об устойчивости бактерий к ДС стали появляться в 1950-х гг., практически сразу же после начала применения в медицине катионных веществ.

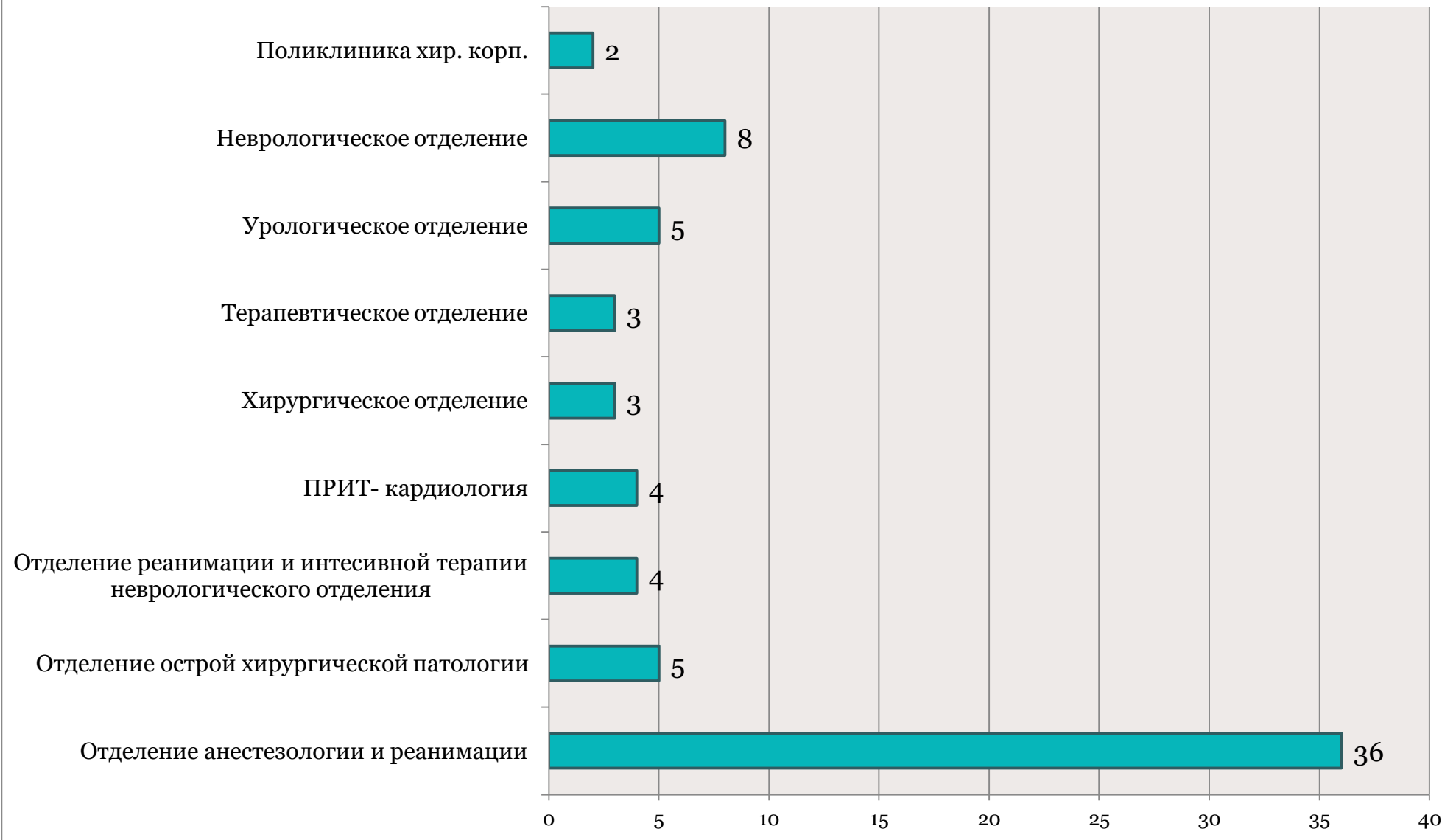
В научной литературе описана устойчивость ко всем основным группам химических соединений: хлор-, йод-, альдегид-, фенол-, спирт-кислородсодержащим, ЧАС, третичным аминам, гуанидинам и другим ДС В последние десятилетия число сообщений о выявлении устойчивых к дезинфицирующим средствам микроорганизмов увеличилось, что привело к признанию специалистами факта приобретения некоторыми штаммами устойчивости к воздействию дезинфектантов в рекомендуемых для дезинфекции концентрациях и экспозициях

- Исследования проведенные в ФБУН НИИДезинфектологии Роспотребнадзора показали, что при систематическом воздействии суббактерицидных концентраций ДС микроорганизмы приобретают устойчивость и к более высоким концентрациям, которые обладают достаточной эффективностью в отношении музейных штаммов микроорганизмов.



<b>Вид микроорганизма</b>	<b>Общее количество штаммов</b>	<b>Количество резистентных штаммов</b>	<b>Резистентные штаммы, %</b>
<i>A.baumannii</i>	31	14	45,16
<i>P.aeruginosa</i>	39	27	69,23
<i>K.pneumoniae</i>	102	38	37,25
<i>Staphylococcus spp.</i>	18	12	66,67
<i>Enterococcus spp.</i>	9	7	77,78
<i>E.coli</i>	15	4	26,67
<i>Прочие</i>	12	10	83,33
<i>Всего</i>	226	112	49,56

## Распределение штаммов по отделениям МО

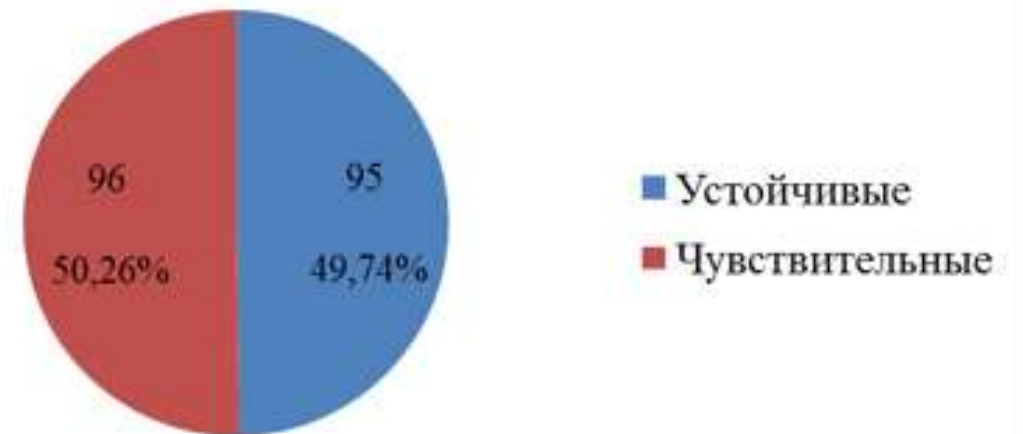


Химическая группа ДС	Количество образцов	%	Количество резистентных штаммов
КПАВ	16	61,54	78
Хлорсодержащие	4	15,38	9
Кислородактивные	4	15,38	29
КПАВ+ кислородактивные	2	7,69	16
Всего	26		

---

Устойчивостью к применяемым дезинфицирующим средствам обладают 49,74% штаммов микроорганизмов, переданных на исследования. Стоит отметить, что 87,37% устойчивых штаммов микроорганизмов относятся к группе *ESKAPE*, что подчеркивает их клиническую и эпидемиологическую значимость

Количество госпитальных штаммов микроорганизмов, устойчивых к применяемым ДС





- Чувствительность микрофлоры к применяемым ДС в настоящее время рассматриваться как один из основных факторов, влияющих на качество дезинфекционных мероприятий в медицинских организациях (МО).
- Чувствительность различных микроорганизмов к указанным средствам может варьировать в зависимости от типа МО, особенностей санитарно-противоэпидемического режима, политики применения ДС.
- Способность микроорганизмов адаптироваться к воздействию неблагоприятных факторов, в том числе применяемых в МО дезинфицирующих средств, обуславливает возможность формирования устойчивых штаммов.



# Виды резистентности микроорганизмов



[Cloete T. E., Russel A.D., McDonnell G.]

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks – SCENIHR) в 2009 г. были обобщены имеющиеся сведения об устойчивости микроорганизмов к биоцидам и выделены следующие механизмы устойчивости:


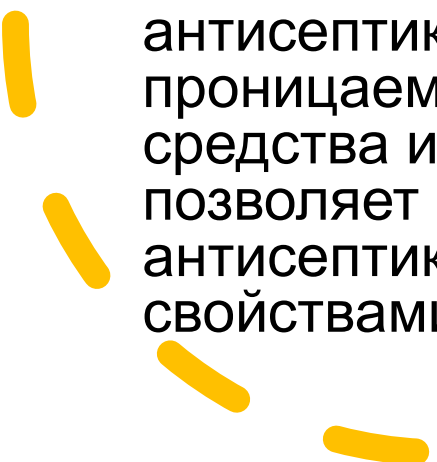
- Проницаемость - модификация структуры оболочки бактерий, которая приводит к снижению ее проницаемости
- Эффлюкс - системы активного энергозависимого транспорта и выброса антимикробных соединений из клеток
- Деградация,
- Мутации,
- Фенотипические изменения - ответная реакция на воздействие ДС (образование биопленок)
- Индукция- формирующаяся в результате воздействия суббактерицидных концентраций ДС как адаптацию микроорганизмов, сопровождающуюся фенотипическими изменениями клеток.

## Сведения о чувствительности/устойчивости различных микроорганизмов к основным группам дезинфектантов

Микроорганизмы	Четвертичные аммониевые соединения	Производные гуанидинов	Третичные алкиламины	Кислород-активные	Хлор-активные	Альдегиды	Спирты
Бактерии	+	+	+	+	+	+	+
Вирусы парентеральных гепатитов, гриппа и ОРВИ, геморрагических лихорадок, ВИЧ, герпес-вирусы, аденовирусы, ротавирусы	+	+	+	+	+	+	+
Дерматофиты, грибы р. <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i>	+	+	+	+	+	+	+
Полиовирусы, энтеровирусы, норовирусы, ВГА	±	±	+	+	+	+	±
Микобактерии	-	-	+	+	+	+	+
Споры бактерий	-	-	-	+	±	+	-

### Примечание:

- + вещества данной группы обладают активностью;
- ± не все вещества данной группы обладают активностью;
- вещества данной группы не обладают активностью.

- 
- Формирование приобретенной резистентности к АП всегда связано с восприятием новой генетической информации и/или с изменениями собственных генов. Приобретенная резистентность у бактерии не может исчезнуть сама по себе. Однажды появившись, устойчивая популяция микроорганизмов может быть элиминирована только в случае гибели микробных клеток.
  - В настоящее время только накапливаются данные об общих генетических механизмах устойчивости микробных клеток к антибиотикам, ДС и антисептикам. Прежде всего речь идет о таких механизмах, как снижение проницаемости клеточной стенки и активное выведение антимикробного средства из клетки. Наличие этих механизмов резистентности у бактерий позволяет им выдерживать значительно более высокие концентрации ДС и антисептиков по сравнению с культурами, не обладающими такими свойствами.
- 

- Эффективность действия на микроорганизмы ДС и антисептиков из разных химических групп в первую очередь зависит от их способности проникать внутрь клетки и взаимодействовать с ее различными функциональными группами.
- Сильное дестабилизирующее действие на мембраны клеток оказывают катионные поверхностно-активные вещества (КПАВ), в том числе четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) и полигексаметиленгуа-нидины (ПГМГ). Они широко применяются в МО в виде монопрепаратов, в комбинации друг с другом и иными активными веществами.
- Действие ЧАС и ПГМГ на чувствительные бактериальные клетки происходит в несколько этапов: адсорбция молекул на клеточной стенке и проникновение через нее; взаимодействие с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, за которым следует ее дезорганизация; вытекание внутриклеточных низкомолекулярных веществ; распад белков и нуклеиновых кислот; лизис клеточной стенки, вызванный аутолитическими ферментами

- Видовая резистентность микобактерий к ЧАС связана с повышенным содержанием липидов и восков, придающих выраженную гидрофобность клеточной стенке [12]. Вследствие этого гидрофильные молекулы ДС не могут проникнуть через клеточную стенку в количествах, необходимых для достижения микобактерицидного эффекта.
- Приобретенная устойчивость бактерий к ЧАС может быть обусловлена генотипическими (наличие генов устойчивости, локализованных в плазмидах и транспозонах) или фенотипическими механизмами. Генотипическая устойчивость с локализацией генов на плазмиде описана для *S. epidermidis*. Показано, что около 40% изолятов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных из клинического материала в нескольких клиниках Австралии, имеют ген устойчивости к ЧАС, локализованный в Р-плазмиде, детерминирующей резистентность к некоторым антибиотикам и солям тяжелых металлов [13].

# Виды устойчивости:

- **Ассоциированная** устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к дезинфицирующим средствам, относящимся к разным группам химических соединений по действующему веществу.
- **Комбинированная** устойчивость микроорганизмов к антибактериальным средствам – одновременная устойчивость к различным антибактериальным средствам (дезинфектантам, антибиотикам, антисептикам и пр.).
- **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.



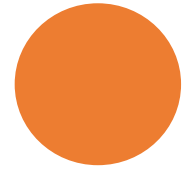
# Виды устойчивости:

- **Перекрестная** устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к различным дезинфектантам, относящимся к одной группе химических соединений на основе одного действующего вещества.
- **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.
- **Сочетанная** устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам - устойчивость к двум и более дезинфектантам из одной группы химических соединений, но с различными действующими веществами.

# Факторы, способствующие формированию устойчивости госпитальной микрофлоры к дезинфицирующим средствам (ДС)

- использование ДС в низких концентрациях и при недостаточной экспозиции;
- «человеческий фактор» при использовании ДС (несоблюдение правил приготовления рабочих растворов ДС и сроков экспозиции);
- некорректная пропаганда фирмами производителями низких рабочих концентраций своих дезинфектантов, диктуемая не объективными данными, а прагматичной политикой сиюминутной “экономии” и финансовой привлекательности для потребителя;
- Адаптационная способность к систематическому воздействию ДС, что ведет к изменению поверхностных структур клетки под действием дезинфектанта
- использование населением в быту различных средств с антибактериальным эффектом

Необходимость изучения и динамического наблюдения за устойчивостью микроорганизмов к ДС и антисептикам обусловлена целым рядом факторов:



## Мониторинг, определение, виды

**Мониторинг устойчивости к дезинфицирующим средствам** – наблюдение за состоянием чувствительности к дезинфицирующим средствам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных в медицинских организациях от пациентов, персонала и с/из различных объектов внешней среды

Виды мониторинга (в зависимости от профиля отделения, эпидситуации и т.д.):

- тотальный
- целенаправленный
- комбинированный

# Методики исследования чувствительности госпитальной микрофлоры к ДС

- Методика определения чувствительности (устойчивости) бактерий к дезинфектантам (Красильников А.П. и соавт., 1994 г.)
- Метод ускоренного определения устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам (Леви М.И., Сучков Ю.Г., 2000 г.)
- Определение чувствительности микроорганизмов к дезинфектантам и антисептикам методом диффузии в агар с использованием дисков (2004 г.)
- Р 4.2.3676—20 Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.—492 с.
- Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующему средству (Шкарин В.В. и соавт., 2010 г., ФКР «Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях» 2015 г.)

# Требования к методикам оценки чувствительности госпитальной микрофлоры



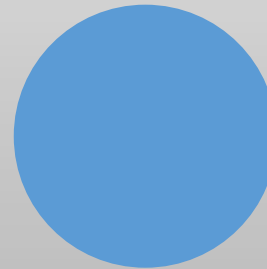
Доступность проведения в микробиологических лабораториях МО;



Простота проведения методики;



Безопасность для специалистов микробиологических лабораторий МО;



Наличие в методике этапа нейтрализации действия ДС.

## МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях»

Мероприятия по оценке чувствительности к ДС микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях, должны включать:

- – эпидемиологический надзор за уровнем и распространенностью ИСМП;
- – микробиологическую диагностику ИСМП;
- – санитарно-бактериологические исследования объектов внутрибольничной среды;
- – оценку чувствительности микроорганизмов к ДС;
- – организацию и проведение мер по повышению эффективности дезинфекционных мероприятий

# Оценка чувстви- тельности микро- организмов к ДС

- следует проводить в отношении микроорганизмов, циркулирующих в МО, выделенных с объектов внешней среды, при отборе санитарно-бактериологических смывов в рамках производственного контроля, либо по эпидемиологическим показаниям.
- Также могут быть использованы микроорганизмы, выделенные из патологических локусов пациентов.
- Дезинфицирующие средства исследуются в тех режимах, в которых используются в медицинской организации более шести месяцев.
- Обязательно использование нейтрализатора.
- необходимо проводить не реже одного раза в шесть месяцев по предварительно составленному графику или по эпидемиологическим показаниям.



Для выявления микроорганизмов на объектах окружающей среды (медицинские изделия, поверхности столов, поручни кроватей, дверные ручки, посуда, материал от больных и т. д.) отбирают смывы в палатах, операционных, перевязочных, манипуляционных, родовых залах, столовых, в других помещениях в соответствии с МУК 4.2.2942—11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях». Каждый последующий отбор проб целесообразно производить в одних и тех же точках.



Перед оценкой чувствительности микроорганизма к ДС проводят предварительную **идентификацию выделенного микроорганизма** до вида любым доступным методом (изучение биохимических, антигенных, фаголитических и других свойств культуры, использование автоматических микробиологических анализаторов и т. д.).




Чувствительность микроорганизмов к ДС определяют с использованием тест-объектов, имитирующих те объекты внешней среды, с которых были взяты образцы.


Обработку тест-объектов проводят по режимам, указанным в Инструкции по применению конкретного ДС, соблюдая все рекомендации:

- концентрацию,
- время обеззараживания,
- способ обработки,
- норму расхода,
- температуру рабочего раствора,
- загрязненность объекта.

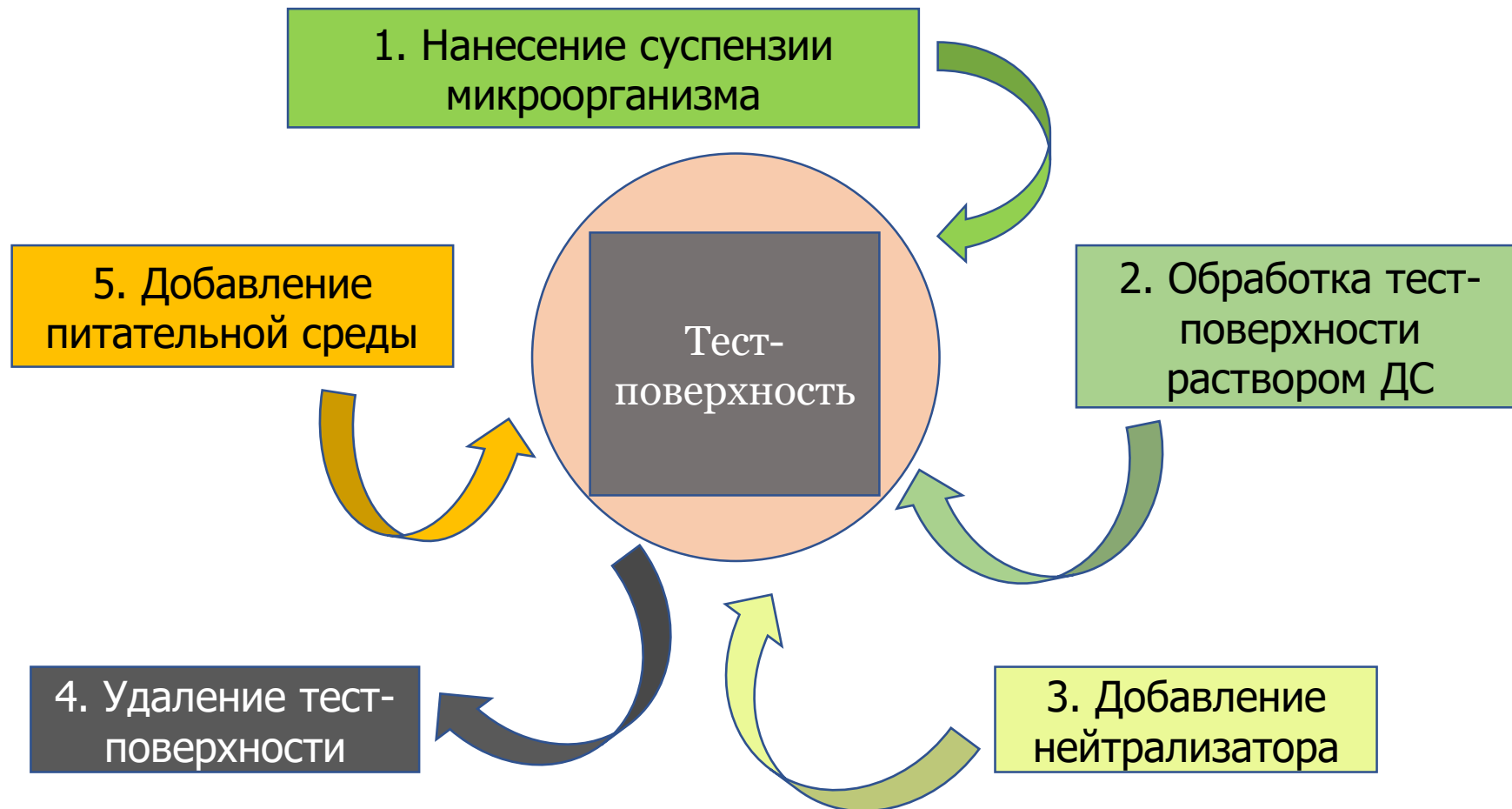




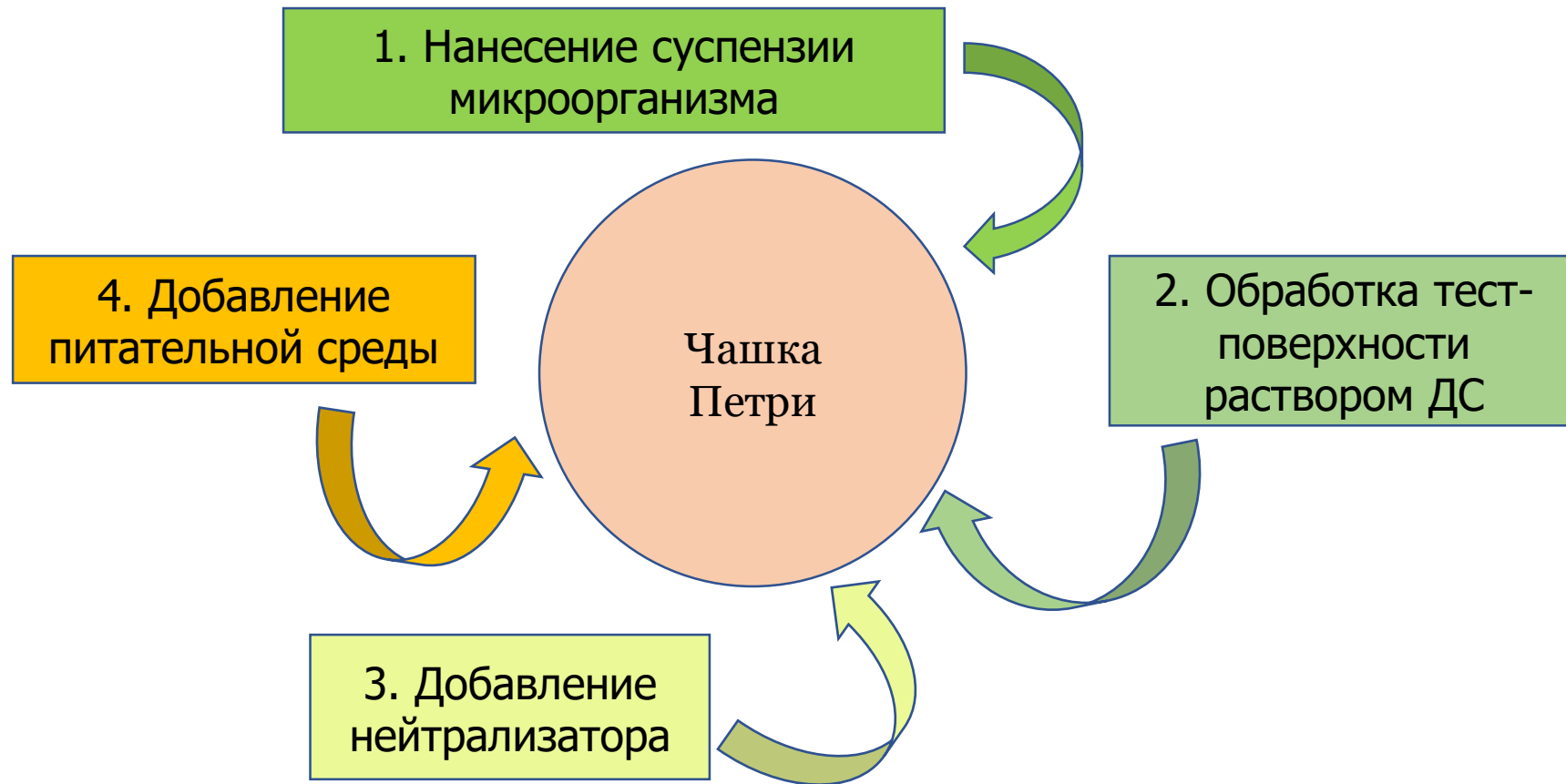
Для нейтрализации действующего вещества (ДВ), которое может быть перенесено с материалом тест-объекта при его посеве в питательную среду, используют **нейтрализатор** – вещество, которое устраняет (нейтрализует) действие химического агента на микробную клетку, но не убивает и не задерживает рост тест-микроорганизма.



«Усовершенствованная методика исследования чувствительности»  
(МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях»)



«Упрощенная методика оценки чувствительности»  
(патент № 2650760 «Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам»)



# Учет результатов



проводят по сравнению с контрольной тест-поверхностью, которую вместо раствора ДС обрабатывают водопроводной водой.




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



по наличию или отсутствию роста делают вывод об устойчивости изучаемого микроорганизма к ДС и принимают решение о необходимости ротации.



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

- – при установлении чувствительности госпитального штамма микроорганизма к действию дезинфицирующего средства 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 дезинфицирующего средства в испытанном режиме применения, данное дезинфицирующее средство следует заменить на другое.