ПРИЛОЖЕНИЕ
к Решению Коллегии
Евразийской экономической комиссии
от « » 20 г. №

И З М Е Н Е Н И Я,
вносимые в раздел 20 главы II Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)

Раздел 20 Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), изложить в следующей редакции:

«Раздел 20. Требования к дезинфекционным средствам

1. Область применения

Настоящие требования распространяются на дезинфекционные средства в виде различных препаративных форм, предназначенные для профессионального применения, розничной продажи населению (кроме средств, применяемых в ветеринарии и сельском хозяйстве) (коды ТН ВЭД ЕАЭС 3808).

2. Термины и определения

Для целей настоящего раздела используются понятия, которые означают следующее:

«безопасность дезинфекционных средств» – приемлемая вероятность отсутствия вредного эффекта их воздействия на людей и окружающую среду при определенных условиях и режимах;

«дезинсекционные средства» – средства, применяемые для снижения до приемлемого уровня или уничтожения членистоногих на/в объектах внешней среды;

«дезинфектологическая экспертиза» – процедура рассмотрения и оценки материалов, характеризующих дезинфекционное средство, включая результаты лабораторных, инструментальных, натурных исследований и испытаний химического состава, безопасности, целевой эффективности, а также сопровождающей дезинфекционное средство нормативной, методической и инструктивной документации, осуществляемая с целью защиты жизни или здоровья граждан, предупреждения действий, вводящих в заблуждение потребителей. Результатом дезинфектологической экспертизы является экспертное заключение;

«дезинфекционные средства» – средства, предназначенные для проведения дезинфекции (дезинфицирующие средства), предстерилизационной очистки, стерилизации (стерилизационные средства, изделия), дезинсекции (инсектицидные, педикулицидные, акарицидные средства), дератизации (дератизационные средства), а также репеллентные средства;

«дезинфицирующие средства (средства обеззараживания)» – средства, применяемые для снижения до приемлемого уровня или уничтожения микроорганизмов в/на объектах окружающей среды;

«дезинфицирующее средство для дезинфекции высокого уровня эндоскопов» – средство, обеспечивающее гибель вегетативных форм

бактерий (в том числе микобактерий), грибов, оболочечных и безоболочечных вирусов и некоторого количества спор;

«действующее вещество (субстанция)» – химические и/или биологические вещества, входящие в состав дезинфекционных средств, обеспечивающих целевую эффективность»;

«дератизационные средства» – средства, применяемые для снижения численности грызунов до приемлемого уровня или их уничтожения;

«обращение дезинфекционного средства» – жизненный цикл дезинфекционного средства, включающий разработку, регистрацию, производство, транспортирование, реализацию, применение, утилизацию и/или уничтожение;

«оценка реальной опасности» – определение и оценка негативного воздействия дезинфекционного средства и условий (технологии) его применения на здоровье людей и объекты окружающей среды при длительном и кратковременном контакте;

«препаративная форма» – готовое к применению по целевому назначению дезинфекционное средство, состоящее из действующего вещества (субстанции) или смеси действующих веществ и функциональных компонентов;

«режим применения» – совокупность факторов, условий, технологии применения дезинфекционного средства, обеспечивающая достижение целевой эффективности и безопасности;

«репеллентные средства» – средства, предназначенные для отпугивания членистоногих или грызунов;

«средства предстерилизационной очистки» – средства, предназначенные для удаления загрязнений с медицинских изделий, препятствующих стерилизации или снижающих ее эффективность;

«срок ожидания» – период времени с момента завершения обработки дезинфекционным средством объекта, помещения (территория) до его безопасного использования;

«стерилизующие средства» – средства, предназначенные для уничтожения всех видов микроорганизмов, в том числе бактерий, вирусов, прионов, грибов на всех стадиях развития;

«эффективность дезинфекционного средства (эффективность обеззараживания)» – абсолютный или относительный показатель, характеризующий достигнутый уровень стерилизации, дезинфекции, дезинсекции, дератизации.

3. Требования (критерии) к безопасности и эффективности дезинфекционных средств

Безопасность и эффективность дезинфекционных средств обеспечивается совокупностью требований к физико-химическим, токсикологическим и биологическим показателям.

Для определения безопасности препаративных форм дезинфекционных средств оцениваются:

а) химические и физические свойства дезинфекционных средств, включая их летучесть, стабильность, совместимость с другими соединениями (сведения представляются производителем);

б) данные ФАО/ВОЗ (при их наличии), или Европейского союза, или Агентства по охране окружающей среды США (EPA) по оценке опасности ввозимых дезинфекционных средств;

в) токсикологическая характеристика компонентов препаративной формы - наполнители, эмульгаторы, стабилизаторы, растворители и иные, с указанием для каждого из них действующего стандарта, либо регистрации в системе REACH, либо регистрационного номера CAS, наименования IUPAC;

г) острая токсичность при приведении в желудок;

д) острая токсичность при нанесении на кожу;

е) острая ингаляционная токсичность;

ж) острая токсичность при введении в брюшную полость;

з) раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз;

и) сенсибилизирующее действие;

к) кумулятивное действие;

л) кожно-резорбтивное действие;

м) подострая ингаляционная токсичность;

н) подострая токсичность при внутрижелудочном поступлении;

о) хроническая токсичность при внутрижелудочном поступлении;

п) влияние на органолептические свойства (запах, привкус) воды;

р) гигиенические нормативы (ПДК/ОБУВ) ДВ в воздухе рабочей зоны, в атмосферном воздухе населенных мест, в воде водных объектов[1];

с) гигиенические нормативы (ПДК) продуктов трансформации ДВ, вредных примесей и продуктов трансформации под действием ДВ в воде водных объектов (для средств обеззараживания всех видов вод);

---

[1] гигиеническое нормирование не требуется для действующих веществ, которые не классифицируются как опасные по параметрам острой токсичности при внутрижелудочном, накожном, ингаляционном поступлении в организм, по способности обладать раздражающим, кожно-резорбтивным, сенсибилизирующим, репротоксичным, мутагенным, канцерогенным действием»;

т) данные об отдаленных эффектах (мутагенный, канцерогенный, эмбриотоксический, тератогенный, влияние на репродуктивную и эндокринную системы);

у) реальная опасность в рекомендуемых режимах применения;

ф) специфическая эффективность препаративных форм средств дезинфекции.

В качестве действующих веществ запрещается использовать химические вещества, подпадающие под действие Роттердамской конвенции о процедуре предварительного обоснованного согласия и приложений А и В Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях.

Отнесение кожных антисептиков и средств для обработки инъекционных и операционных полей к дезинфицирующим или лекарственным средствам, а также экспертиза и регистрация кожных антисептиков и средств для обработки инъекционных и операционных полей, осуществляется в соответствии с национальным законодательством государств-членов.

Нормативные показатели токсичности и безопасности, физико-химические показатели дезинфекционных средств принимаются в соответствии с Приложением 20.1.

Изучение и оценку токсичности и безопасности проводят в соответствии с нормативной документацией, приведенной в Приложении 20.1.

Изучение и оценку эффективности дезинфекционных средств проводят в соответствии с Приложением 20.2.

4. Дезинфектологическая экспертиза

Дезинфектологическая экспертиза с целью государственной регистрации основывается на следующих принципах:

обязательность проведения;

научная обоснованность (доказательность);

независимость экспертов при осуществлении ими своих полномочий;

полнота проведения экспертизы;

обеспечение конфиденциальности рассматриваемых материалов;

платность проведения экспертизы.

Дезинфектологическую экспертизу дезинфекционных средств осуществляют организации уполномоченных органов, аккредитованные в установленном порядке.

Порядок организации и проведения дезинфектологической экспертизы определяется в соответствии с национальным законодательством государств-членов.

Для экспертизы дезинфекционных средств изготовителем (поставщиком, регистрантом) предоставляется досье, включающее:

рецептуру средства;

технические условия или иной нормативно-правовой документ на выпускаемую продукцию, стандарт организации-производителя (для продукции, произведенной на территории государств-членов);

спецификацию (для импортной продукции);

инструкцию (проект) по применению средства, включающую общие сведения о средстве, его назначении, действующих веществах, токсикологическую характеристику, приготовлении рабочих растворов,

рекомендации по применению, меры безопасности и первой помощи в случаях отравлений дезинфекционным средством, способы утилизации;

методы контроля качества средства, включая метод контроля действующего вещества;

справку о стабильности/сроки годности средства;

образец этикетки;

токсикологическую характеристику действующего вещества, основных компонентов и препаративной формы, в целом, гигиенические нормативы в объектах окружающей среды (вода, воздух, почва)[2];

методы контроля действующего вещества и/или продуктов его трансформации в объектах окружающей среды (вода, воздух, почва);

паспорт безопасности действующего вещества и средства (MSDS) и/или лист безопасности в полном объеме, включая отдаленные эффекты (мутагенная активность, тератогенное действие, канцерогенное и эмбриотоксическое действие, гонадотоксическое действие);

данные о безопасности наноматериалов в случае их введения в состав дезинфекционного средства;

результаты исследования целевой эффективности и безопасности;

---

[2] гигиеническое нормирование не требуется для действующих веществ, которые не классифицируются как опасные по параметрам острой токсичности при внутрижелудочном, накожном, ингаляционном поступлении в организм, по способности обладать раздражающим, кожно-резорбтивным, сенсибилизирующим, репротоксичным, мутагенным, канцерогенным действием»;

меры безопасного обращения с дезинфекционным средством, приведенные в нормативных правовых актах на продукцию или в паспорте безопасности;

образец препаративной формы дезинфекционного средства в упаковке производителя с актом отбора образцов (проб) для продукции, произведенной на территории государств-членов;

стандартный образец действующего вещества дезинфекционного средства.

По итогам дезинфектологической экспертизы дезинфекционных средств оформляется экспертное заключение о возможности государственной регистрации дезинфекционного средства на таможенной территории Евразийского экономического союза, содержащее следующие сведения:

наименование дезинфекционного средства (его препаративная форма);

изготовитель препаративной формы;

изготовитель действующего вещества (веществ) дезинфекционного средства;

токсикологическая характеристика дезинфекционного средства и его рабочих растворов и форм, готовых к применению;

основные результаты химико-аналитического контроля, оценки целевой эффективности и безопасности дезинфекционного средства;

целевое назначение дезинфекционного средства;

область применения дезинфекционного средства;

рекомендации к государственной регистрации на таможенной территории Союза.

В случае отсутствия необходимых материалов для дезинфектологической экспертизы дезинфекционного средства, отсутствия целевой эффективности, выявления неустранимых негативных токсиколого-гигиенических свойств или получения отрицательных результатов в ходе проведения экспериментальных исследований и т.п., выдается обоснованное заключение о невозможности государственной регистрации дезинфекционного средства.

5. Упаковка и маркировка

Тара (упаковка) для дезинфекционных средств выполняется из материалов, обеспечивающих сохранность продукции и исключающих возможность загрязнения дезинфекционными средствами окружающей среды при их хранении, транспортировке и применении.

Тара для упаковки агрессивных дезинфекционных средств, в том числе с pH менее 2,0 ед. и более 11,5 ед., должна быть снабжена специальным устройством для их безопасного розлива.

Транспортная маркировка наносится непосредственно на тару печатными машинами, либо по трафарету, либо наклейкой этикеток (стикеров). Она должна содержать: наименование средства, манипуляционные знаки, классификационный шифр, информацию для потребителя с обязательным указанием номера партии, даты изготовления (месяц, год) и гарантийного срока хранения.

Приложение 20.1 к разделу 20
Единых санитарно-эпидемиологических и
гигиенических требований к продукции (товарам),
подлежащей санитарно-эпидемиологическому
надзору (контролю)

Нормативные показатели токсичности и безопасности дезинфекционных средств

1. Показатели токсичности и безопасности дезинфекционных средств

1.1. Дезинфицирующие средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
1.1.1. Средства для дезинфекции поверхностей помещений, жесткой мебели, аппаратов и приборов, белья, обуви, посуды столовой, лабораторной и из под выделений, игрушек (кроме мягких), санитарно-технического оборудования, предметов ухода за больными, выделений, мусоропроводов, мусоросборников (способы обработки: протирание, орошение, замачивание и погружение)**,** отходов				
1.1.1.1. Дезинфицирующие средства в форме концентрата, жидкости, порошка, гранул, таблеток, геля т.д.	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	>150 (> 50 - ≤ 2000) > 5000 (>2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	**Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500	3-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки)
		> 200 - ≤ 2000	(3-4)	
		> 2000	4	
		(>2000)	(5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20}) при 20° С	C_{20}- клиника	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 4	1-2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(≥ 2,3)	(1-2)	
		2,1-4,0	3	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	
		0 - 2,0	4	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	более 4	1-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4-5	Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие	умеренное/слабое	3А/3В	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ
		(умеренное/низкое)	(1В)	

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	(кожное/респираторное)			(резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта	4	Специалистам и населению в быту
		(отсутствие эффекта)	(не классифицируется)	
1.1.1.2. Рабочие растворы дезинфицирующих средств	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1-4,0	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	
		0 - 2,0	4	Специалистам и населению в быту
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/ слабое	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4-6	3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4-5	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Ингаляционная опасность в режимах применения:	менее 1	1	По эпид.показаниям специа-листам с применением СИЗ (противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
	Зона острого токсического действия:	1-3	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) в отсутствие пациентов
		3,1-10	3	Специалистам в отсутствие пациентов
		более 10	4	Специалистам и населению в быту
	Зона подострого токсического действия	менее 10	не классифицируется	Специалистам в отсутствие пациентов
		более 10		Специалистам в присутствии пациентов и населению в быту
	Оценка безопасности остаточных количеств ДС на посуде (по выбору):			
	- цитотоксичность: культура клеток (ККЛ)	степень ЦТД - (не более 1)		Без ограничений
	сперматозоиды быка	индекс токсичности 70-120%	не классифицируется	Без ограничений
	- гемолиз эритроцитов	не более 2%		Без ограничений
	- пирогенность	отсутствие эффекта		Без ограничений
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ >1	1-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)			очки, резиновые перчатки) в отсутствие пациентов
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.} \leq 1$	1-4	Специалистам в отсутствие пациентов
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.} \leq 1$	3-4	Специалистам в присутствии пациентов и населению в быту
1.1.2. Дезинфицирующие средства в аэрозольной форме, предназначенные для обработки воздуха и поверхностей помещений объемным методом, а также поверхностей – направленными аэрозолями				
1.1.2.1. Средства в аэрозольной форме	Ингаляционная опасность в режиме применения:	менее 1	1	По эпид.показаниям специалистам с применением СИЗ (противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
	Зона острого токсического действия:	1-3	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) в отсутствие пациентов
		3,1-10	3	Специалистам в отсутствие пациентов
		более 10	4	Специалистам
	Зона подострого токсического действия	менее 10	не классифицируется	Специалистам в отсутствие пациентов
		более 10		Специалистам в присутствии пациентов

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3) 0 – 2,0 (< 1,5)	3 (3) 4 (не классифицируется)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4-6 0-3	3 4-5	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое) отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	3А/3В (1В) 4 (не классифицируется)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$ $С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}\leq1$ $С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}\leq1$	1-4 1-4 3-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) в отсутствие пациентов Специалистам в отсутствие пациентов Специалистам в присутствии пациентов
1.1.2.2. Дезинфицирующие средства для обеззараживания отходов в форме концентрата, жидкости, порошка, гранул, таблеток, геля т.д.	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 - ≤ 2000) > 2000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
		> 2000	4	Специалистам и населению в быту
		(> 2000)	(5)	
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	C_{20}- клиника	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 4	1-2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки)
		(≥ 2,3)	(1-2)	
		2,1 – 4,0	3	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	
		0 – 2,0	4	Специалистам и населению в быту
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
1.1.3. Средства для дезинфекции систем вентиляции и кондиционеров (способы обработки: протирание, орошение)				
1.1.3.1. Средство в форме водных растворов, аэрозолей направленного действия	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 5000	4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(> 2000)	(5)	
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 2000	4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(> 2000)	(5)	
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	0-3	4-5	Специалистам
	Ингаляционная опасность в режиме применения: Зона острого токсического действия	более 10	4	Специалистам и населению в быту
1.1.4. Средства для дезинфекции транспорта: наземного, железнодорожного и метрополитена, водного, воздушного				
1.1.4.1. Дезинфицирующие средства в форме концентрата, жидкости, порошка, гранул, таблеток, геля т.д.	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 2000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	C_{20}=Lim_{ac}	3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		C_{20}< Lim_{ac}	4	Специалистам

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3 (3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	0-3	4-5	Специалистам
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое) отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	3А/3В (1В) 4 (не классифицируется)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$ $С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}≤1$ $С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}≤1$	3-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам Специалистам и населению в быту
1.1.5. Средства для дезинфекции на объектах общественного питания и торговли				
1.1.5.1. Дезинфицирующие средства в форме концентрата, жидкости, порошка, гранул, таблеток, геля т.д.	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 - ≤ 2000) > 5000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
		> 2000	4	Специалистам и населению в быту
		(> 2000)	(5)	
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам в присутствии людей
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 6,0	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		(≥ 1,5)	(2-3)	
		0 – 2,0	4	Специалистам в присутствии людей
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	> 4	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4-5	Специалистам в присутствии людей
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое	3A/3B	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(умеренное/низкое)	(1B)	
		отсутствие эффекта	4	Специалистам в присутствии людей
		(отсутствие эффекта)	(не классифицируется)	
1.1.5.2. Рабочие растворы дезинфицирующих средств	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0	3	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	
		0 -2,0	4	Специалистам в присутствии людей
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4-6	3	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		0-3	4-5	Специалистам
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам
	Ингаляционная опасность в режимах применения:	менее 1	1	По эпид.показаниям специа-листам с применением СИЗ (противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
	Зона острого токсического действия:	1-3	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) в отсутствие людей
		3,1-10	3	Специалистам в отсутствие людей
		более 10	4	Специалистам
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам в присутствии людей
	Оценка безопасности остаточных количеств ДС (по выбору):			
	- цитотоксичность: культура клеток (ККЛ)	степень ЦТД - (не более 1)	не классифицируется	Без ограничений
	сперматозоиды быка	индекс токсичности 70-120%		Без ограничений

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Контроль смываемости (химико-аналитический метод остаточных количеств действующего вещества)	отсутствие остатков	не классифицируется	Без ограничений
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) при проведении генеральных уборок
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}\leq 1$	2-4	Специалистам в отсутствие людей
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м}\leq 1$	3-4	Специалистам в присутствии людей
1.1.6. Дезинфицирующие средства быстрого действия при чрезвычайных ситуациях				
1.1.6.1. Дезинфицирующие средства в форме концентрата, жидкости, порошка. таблеток	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 15 (> 5 -≤ 2000)	2-4 (2-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 100 (> 50 -≤ 2000)	2-4 (2-4)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		> 2000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров ($С_{20}$)	$С_{20}$ –гибель $С_{20}$- клиника	1-2	Специалистам по эпид. показаниям с применением СИЗ (противогаз/респираторы,

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 6 (некроз)	1 (1)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		2,1 – 6,0 (≥ 1,5)	2-3 (2-3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	> 4	1-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4	Специалистам
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
1.1.6.2. Рабочие растворы дезинфицирующих средств	Ингаляционная опасность в режиме применения: Зона острого токсического действия	менее 1	1	По эпид.показаниям специалистам с применением СИЗ (противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		1-3	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
				очки, резиновые перчатки) в отсутствие людей
		3,1-10	3	Специалистам в отсутствие людей
		более 10	4	Специалистам
1.1.7. Средства для дезинфекции и предстерилизационной очистки медицинских изделий, включая эндоскопы, стоматологические инструменты и оттиски				
1.1.7.1. Средство в форме - концентрата, жидкости, порошка, гранул и т.д.	Острая токсичность при введении в брюшную полость (DL_{50}, мг/кг)	не менее 11	2-6	Специалистам
	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 2000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 4 (≥ 2,3)	1-2 (1-2)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	> 4<10	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4	Специалистам
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
1.1.7.2. Рабочие растворы средства	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3 (3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам
	Оценка безопасности остаточных количеств ДС (по выбору):			
	- цитотоксичность: культура клеток (ККЛ)	степень ЦТД - (не более 1)	не классифицируется	Без ограничений
	сперматозоиды быка	индекс токсичности 70-120%		Без ограничений
	- гемолиз эритроцитов	не более 2%		Без ограничений
	- пирогенность	отсутствие эффекта		Без ограничений

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
1.1.8. Средства для обеззараживания поверхностей технологического оборудования и помещений на предприятиях в различных отраслях пищевой промышленности				
1.1.8.1. Дезинфицирующее средство в форме - концентрата, жидкости, порошка, гранул, аэрозолей и т.д.	Острая токсичность при введении в желудок(DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		> 2000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	C_{20}- клиника	2	Специалистам с применением СИЗ(противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 6 (некроз)	1 (1)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		2,1 – 6,0 (≥ 1,5)	2-3 (2-3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	> 4	1-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		0-3	4	Специалистам
	Кумулятивный эффект (по классификации Медведя Л.И.)	3,1-5	умеренный	Специалистам
		>5	слабый	Специалистам
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
1.1.8.2. Рабочие растворы дезинфицирующего средства	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3 (3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта		Специалистам
	Оценка безопасности остаточных количеств ДС (по выбору):			
	- цитотоксичность: культура клеток (ККЛ) - сперматозоиды быка	степень ЦТД - (не более 1) индекс токсичности 70-120%	не классифицируется	Без ограничений
	Контроль смываемости (по результатам исследований химико-аналитическими методами	отсутствие остатков	не классифицируется	Без ограничений

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативы		Разрешено применение
		Величина Показателя	Классификационная оценка*	
	остаточных количеств ДВ)			
1.1.9. Антимикробные материалы				
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}\leq1$	2-4	
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}\leq1$	3-4	Специалистам
				Специалистам в присутствии людей и населению в быту
1.1.9.2. Дезинфицирующие средства для придания тканям антимикробных свойств	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Персоналу, пациентам и населению в быту
	Анализ токсичности на сперматозоидах быка (вытяжка из ткани)	индекс токсичности 70-120%		Персоналу, пациентам и населению в быту
	Кожно-резорбтивное и раздражающее действие на кожу средства и ткани (14/28 дн.)	Отсутствие эффектов	не классифицируется	Персоналу, пациентам и населению в быту

1.2. Стерилизующие средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.2.1. Стерилизующие средства в форме концентрата, жидкости, порошка т.д.	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 15	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(> 5 -≤ 2000)	(2-4)	
		> 5000	4	Специалистам
		(> 2000)	(5)	
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	> 100	2-4	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		(> 50 -≤ 2000)	(2-4)	
		> 2000	4	Специалистам
		(> 2000)	5	
	Острая токсичность при введении в брюшную полость (DL_{50}, мг/кг)	не менее 11	2-6	Специалистам
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	C_{20}- клиника	2	Специалистам с применением СИЗ (противогаз/респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	> 6	1	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		(некроз)	(1)	
		2,1 – 6,0	2-3	

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
		(≥ 1,5)	(2-3)	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0 – 2,0	4	
		(< 1,5)	(не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
1.2.2. Вытяжки (экстракты или смывы) из медицинских изделий	Оценка безопасности остаточных количеств ДС (по выбору):			
	- цитотоксичность: культура клеток (ККЛ)	степень ЦТД - (не более 1)	не классифицируется	Без ограничений
	сперматозоиды быка	индекс токсичности 70-120%		Без ограничений
	- гемолиз эритроцитов	не более 2%		Без ограничений
	- пирогенность	отсутствие эффекта		Без ограничений
1.2.3. Рабочие растворы стерилизующих средств	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0	3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	
		0 – 2,0	4	
		(< 1,5)	(не классифицируется)	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое отсутствие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам

1.3. Средства для обеззараживания питьевой воды нецентрализованного водоснабжения

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.3.1. Средства для обеззараживания питьевой воды нецентрализованного водоснабжения (таблетки, порошки, растворы, гранулы).	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 50 -≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг).	151 - 2500 (> 200-≤ 1000)	3 (3)	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		> 2500 (>1000)	4 (4-5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность рабочих растворов в максимальной концентрации (в насыщающих концентрациях при 20°С (C_{20})	C_{20}=Lim_{ac}	3	Специалистам с применением СИЗ(защитные очки, резиновые перчатки)
		C_{20}> Lim_{ac}	4	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Раздражающее действие на кожу рабочих растворов в максимальной концентрации (повторно, 10 аппликаций), баллы	2,1 – 4,0 (≥2,3 - <4)	3 (2)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		2,1 – 4,0 (≥1,5-<2,3)	3 (3)	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (<1,5)	4 не классифицируется	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие средства на слизистые оболочки глаз рабочих растворов в различных концентрациях (однократно), баллы	1-6	3-4	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		1-3	4	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки)
		0	5	Специалистам и населению в быту
	Кожное/респираторное сенсибилизирующее действие рабочих растворов в максимальной концентрации (по показаниям)	отсутствие эффекта	не классифицируется	Специалистам и населению в быту
	Отдаленные эффекты: эмбриотоксический, мутагенный, канцерогенный, эмбриотоксический, тератогенный (с учетом данных литературы, баз данных о ДВ и сопутствующих компонентах.)	отсутствие эффекта	не классифицируется	Разрешается производство и применение средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.3.2. Питьевая вода, обработанная дезинфицирующим средством в режиме применения	Испытания обеззараженной природной воды (озерной, прудовой, колодезной, речной и др.) в режиме применения			
	Соотношение минимальной эффективной обеззараживающей концентрации (МЭОК) и ПДКв. по ДВ (МЭОК/ПДКв.)	>10		Разрешается эпизодическое применение средства или запрет
		>5 - 10		Разрешается применение средства в течение 10-15 дн.
		>1 - 5	не классифицируется	Разрешается применение средства в течение 30 дней
		≤1		Разрешается применение средства без ограничения продолжительности
	Определение порога подострого действия обеззараженной децентрлизованной воды по времени наступления эффекта, Lim subac (дни) [1)]	1-3		Эпизодическое применение воды или запрет
		30		Применение воды в течение 10-15 дней
		90		Применение воды в течение месяца
	Органолептические свойства обеззараженной воды в режиме применения (запах, привкус), баллы	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Санитарно-химические показатели безопасности воды	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация ДВ в обеззараженной воде	≤ ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация продуктов трансформации ДВ и продуктов трансформации, образующихся под	≤ ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	влиянием ДВ, в воде			
	Концентрация вредных примесей средства обеззараживания в воде	≤ 0,5ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства

[1)] Определение зоны подострого биоцидного эффекта средств расчет по формуле

$$Z_{subacbioceff.} = \frac{\mathrm{Lim}_{\mathrm{subac}}\,(\textit{по лимитирующему эффекту})}{\text{Суточная норма расхода}}$$

1.4. Средства для обеззараживания воды плавательных бассейнов и аквапарков

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.4.1.Средства для обеззараживания воды плавательных бассейнов и аквапарков (таблетки, порошки, жидкости, гранулы).	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг).	151 - 5000 (>50 - ≤300) > 2500 (> 300)	3 (3) 4 (4-5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу, (DL_{50} мг/кг).	> 500 (>200 - ≤2000) >2000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Ингаляционная опасность средства в насыщающих концентрациях паров (C_{20}).	$C_{20} \geq Lim_{ac}$	2-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие средства на кожу *рабочих растворов в максимальной концентрации* (15 аппликаций), баллы	2,1 – 4,0 (≥2,3 - <4)	3 (2)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		2,1 – 4,0 (≥1,5-<2,3)	3 (3)	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (<1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие на слизистые оболочки глаз *рабочих растворов в максимальной концентрации* (однократно), баллы	4-6	3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки)
		1-3	4	Специалистам и населению применением СИЗ (защитные очки)
		0	5	Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное) *рабочих растворов в максимальной концентрации* (по показаниям)	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Отдаленные эффекты: эмбриотоксический, мутагенный, канцерогенный, эмбриотоксический, тератогенный (с учетом данных литературы, баз данных о ДВ и сопутствующих компонентах.)	отсутствие эффекта	не классифицируется	Разрешается производство и применение средства
	Остаточное обеззараживающее (бактериостатическое) действие	Наличие эффекта Длительность эффекта - ≥1 суток при перманганатной окисляемости воды 5 мгO_2/л	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Соотношение минимальной эффективной обеззараживающей концентрации (МЭОК) и $ПДК_{басс.}$ ДВ (МЭОК/$ПДК_{басс.}$)[1)]	>1		Применение средства не допустимо
		≤1	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Испытания обеззараженной воды плавательного бассейна или аквапарка в режиме применения			
1.4.2. Вода плавательного бассейна или аквапарка, обработанная дезинфицирующим средством в режиме применения	Определение порога подострого действия (28 дней) обеззараженной воды бассейнов при комплексном воздействии (внутрижелудочное,	= 1-5 N		Запрещение применение средства
		10 N		Специалистам и взрослым населением в быту
		>10 N		Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	ингаляционное, кожно-резорбтивное) в зависимости от норм расхода (N), Lim_{subac}			
	Концентрация ДВ в воде плавательного бассейна или аквапарка	$\leq ПДК_{басс.}$	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация продуктов трансформации ДВ в воде	$\leq ПДК_{басс.}$	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация продуктов трансформации, образующихся под влиянием ДВ в воде	≤ ПДКв.	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация вредных примесей средства обеззараживания в воде	≤ 0,5ПДКв.	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация ДВ в воздухе в зоне дыхания пловцов	≤ ПДКа.в.	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Органолептические свойства обеззараженной воды в режиме применения (запах, привкус, мутность, цветность)	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Органолептические свойства обеззараженной воды в режиме применения (пенообразование)	отсутствие	не классифицируется	Разрешается применение средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Санитарно-химические показатели безопасности воды (pH, перманганатная окисляемость)	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства

[1)]рассчитывается по формуле:

$$ПДК_{басс.} = \frac{ДД_{энт}\ (мг/кг) \cdot M\ (кг)}{V\ (л/час) \cdot t\ (час)},\ мг/л$$

$ДД_{энт}$ – допустимая доза, поступающая в организм при заглатывании воды плавательного бассейна, мг/кг;
M – средняя масса пловцов с учетом детей (45 кг);
V – объем заглатываемой жидкости (0,1 л/час);
t – продолжительность сеанса купания (3 часа).

$$ДД_{энт} = ДСД - ДД_{кож} - ДД_{инг},\ где$$

ДСД – допустимая суточная доза;
$ДД_{кож}$ – допустимая доза, поступающая в организм транскутанно при купании, мг/кг;
$ДД_{инг}$ – допустимая доза, поступающая в организм при вдыхании препарата, испаряющегося из воды, мг/кг.

Или

$$ПДК_{басс.} = \frac{ДСД\ (мг/кг) \cdot M\ (кг)}{V\ (л/час) \cdot t\ (час)},\ мг/л,\ где$$

ДСД – допустимая суточная доза;
M – средняя масса пловцов с учетом детей (45 кг);
V – объем заглатываемой жидкости (0,1 л/час);
t – продолжительность сеанса купания (3 часа).

1.5. Средства для обеззараживания воды централизованных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения, в т.ч. в системах горячего водоснабжения

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.5.1. Средства для обеззараживания воды централизованных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения, в т.ч. в системах горячего водоснабжения (газообразные, жидкости, таблетки, порошки, гранулы).	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг).	> 150 (>50 - ≤2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу, (DL_{50} мг/кг).	> 500 (>200 - ≤2000)	3-4	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		> 2000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Ингаляционная опасность средства в насыщающих концентрациях паров (C_{20}).	$C_{20} \geq Lim_{ac}$	2-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие средства на кожу рабочих растворов в максимальной концентрации (15 аппликаций), баллы	2,1 – 4,0 (≥1,5 - <4)	3 (2-3)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		0 – 2,0 (<1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Раздражающее действие на слизистые оболочки глаз рабочих растворов в максимальной концентрации (однократно), баллы	1-6 0	3-4 5	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам
	Сенсибилизирующее действие рабочих растворов в максимальной концентрации	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Разрешается производство и применение средства
	Отдаленные эффекты: эмбриотоксический, мутагенный, канцерогенный, эмбриотоксический, тератогенный (с учетом данных литературы, баз данных о ДВ и сопутствующих компонентах)	отсутствие эффекта	не классифицируется	Разрешается производство и применение средства
	Остаточное обеззараживающее (бактериостатическое) действие	Наличие эффекта Длительность эффекта - ≥1 суток при перманганатной окисляемости воды 5 мгO_2/л	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Соотношение минимальной эффективной обеззараживающей концентрации (МЭОК) и ПДКв. ДВ (МЭОК/ПДКв.)	>1 ≤1	 не классифицируется	Применение средства не допустимо Разрешается применение средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.5.2. Вода централизованных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения, в т.ч. в системах горячего водоснабжения, обработанная дезинфицирующим средством в режиме применения	Испытания обеззараженной воды централизованных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения, в т.ч. в системах горячего водоснабжения, в режиме применения			
	Концентрация ДВ в обеззараженной воде	≤ ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация продуктов трансформации ДВ и продуктов трансформации, образующихся под влиянием ДВ, в воде	≤ ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Концентрация вредных примесей средства обеззараживания в воде	≤ 0,5ПДКв	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Органолептические свойства обеззараженной воды в режиме применения (запах, привкус, мутность, цветность)	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства
	Санитарно-химические показатели безопасности воды (pH, перманганатная окисляемость)	≤ допустимых значений	не классифицируется	Разрешается применение средства

1.6. Средства для обеззараживания в системах технического водоснабжения предприятий

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.6.1. Средства для обеззараживания воды в системах технического водоснабжения предприятий (таблетки, порошки, жидкости, гранулы).	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг).	> 150 (>50 - ≤2000) > 5000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу, (DL_{50} мг/кг).	> 500 (>200-≤2000) > 2000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Ингаляционная опасность средства в насыщающих концентрациях паров (C_{20}).	$C_{20} \geq Lim_{ac}$ $C_{20} < Lim_{ac}$	2-3 4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие средства на кожу *рабочих растворов в максимальной концентрации* (15 аппликаций), баллы	2,1 – 4,0 0 – 2,0	3 4	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
	Раздражающее действие на слизистые оболочки глаз *рабочих растворов в максимальной концентрации* (однократно), баллы	1-6 0	3-4 5	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное) *рабочих растворов в максимальной концентрации*	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Разрешается производство и применение средства
	Отдаленные эффекты: эмбриотоксический, мутагенный, канцерогенный, эмбриотоксический, тератогенный (с учетом данных литературы, баз данных о ДВ и сопутствующих компонентах)	отсутствие эффекта	не классифицируется	Разрешается производство и применение средства
	Остаточное обеззараживающее (бактериостатическое) действие	Наличие эффекта Длительность эффекта - ≥1 суток при перманганатной окисляемости воды 5 мгO_2/л	не классифицируется	Разрешается применение средства

1.7. Дезинсекционные средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.7.1. Аэрозольные баллоны	Зона острого биоцидного эффекта	< 10	1	Специалистам с применением СИЗ в соответствии с действующим законодательством и условиями труда в экстремальных ситуациях.
	Зона острого биоцидного эффекта для спиртсодержащих средств уменьшается на порядок	10 - 30	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
		31 - 100	3	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения (проветривание, расход препарата, влажная уборка и т.д.)
		> 100	4	Специалистам и населению
	Зона подострого биоцидного эффекта	< 1	1	Запрещены для применения в дезинсекции
		1-5	2	Специалистам для обработки производственных помещений с регламентированными

	5,1-10	3	условиями применения за исключением детских, МО и быта.
	>10	4	Специалистам и населением в быту с регламентированными условиями применения (расход препарата, проветривание, уборка помещений) для обработки производственных и жилых помещений
Острая токсичность при введении в желудок без пропеллента, (DL_{50}, мг/кг)	151 - 5000 (> 50 - ≤ 300)	3 (3)	Специалистам и населению в быту Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	> 5000 (> 300)	4 (4-5)	Специалистам и населению в быту
Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3 (3)	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
Острое раздражающее действие на глаза, баллы	< 10	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки).
	0-3	4-5	Специалистам и населению в быту
Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3A/3B (1B)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки,

		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	комбинезон и др.) Специалистам и населению в быту
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ >1	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ ≤1	2-4	
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}$ ≤1	3-4	Специалистам в отсутствие людей Специалистам и населению в быту
1.7.2. Пиротехнические и фумигирующие средства (шашки, таблетки, свечи, жидкости и т.д.)	Зона острого биоцидного эффекта	< 10	1	Специалистам с применением СИЗ (противогазы/респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки,
		10 - 30	2	комбинезон и др.) Специалистам с применением СИЗ (респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки,
		31 - 100	3	комбинезон и др.) Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения (проветривание, влажная уборка, расход препарата).
		> 100	4	Специалистам и населению в быту

Зона подострого биоцидного эффекта	менее 1	1	Запрещены для применения в дезинсекции
	1-5	2	Специалистам для обработки производственных помещений с регламентированными условиями применения за исключением детских, МО и быта
	5,1-10	3	Специалистам и населением в быту для обработки жилых и производственных помещений с регламентированными условиями применения (уборка, проветривание, расход препарата)
	> 10	4	Специалистам и населению в быту
Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг)	151 – 5000 (> 50 -≤ 300) >5000 (> 300)	3 (3) 4 (4-5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту
Острое раздражающее действие на глаза, баллы	<10	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки)
	0-3	4-5	Специалистам и населению в быту

	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.} \leq 1$	2-4	Специалистам в отсутствие людей
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.} \leq 1$	3-4	Специалистам и населению в быту
1.7.3. Эмульгирующиеся концентраты, смачивающиеся порошки, микрокапсулированные концентраты, лаки, краски, растворы	а) Средство:			
	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50} , мг/кг).	151 – 5000	3	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
		(> 50 -≤ 300)	(3)	
		>5000	4	Специалистам и населению в быту
		(> 300)	4-5	
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50} , мг/кг).	> 500	3-4	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки).
		(> 200 - ≤ 2000)	(3-4)	
		> 2000	4	Специалистам и населению в быту
		(> 2000)	(5)	
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях (C_{20})	C_{20} - клиника	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$	3-4	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/	4,1 – 6,0	2	Специалистам с

разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	(≥ 2,3 – < 4,0)	(2)	применением СИЗ (резиновые перчатки)
	2,1 – 4,0	3	
	(≥ 1,5 – < 2,3)	(3)	Специалистам и населению в быту
	0 – 2,0	4	
	(< 1,5)	(не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
Острое раздражающее действие на глаза, баллы	< 10	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки)
	0-3	4-5	Специалистам и населению в быту
Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3A/3B (1B)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
б) Рабочие эмульсии, суспензии, растворы			
Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту
Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту

Зона острого биоцидного эффекта	< 10	1	Специалистам с применением СИЗ (противогазы/респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
	10 - 30	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
	31 - 100	3	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения (уборка, проветривание).
	> 100	4	Специалистам и населению в быту
Зона подострого биоцидного эффекта	< 1	1	Запрещены для применения в дезинсекции
	1-5	2	Специалистам для обработки производственных помещений с регламентированными условиями применения за исключением детских учреждений, МО и быта
	5,1-10	3	Специалистам и населением в быту для обработки жилых и производственных помещений с регламентированными условиями применения

		> 10	4	(уборка, проветривание, расход препарата) Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, респираторы)
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ >1	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
		$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ ≤1	2-4	Специалистам в отсутствие людей
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}$ ≤1	3-4	Специалистам и населению в быту
1.7.4. Дусты, карандаши, брикеты, приманки, готовые к употреблению растворы, эмульсии, суспензии, таблетки, гели	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50} , мг/кг).	151 – 5000 (> 50 - ≤ 300) > 5000 (> 300)	3 (3) 4 (4-5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки) Специалистам и населению в быту.
	Острая токсичность при нанесении на кожу, (DL_{50} , мг/кг).	> 500 (> 200 - ≤ 2000) > 2000 (> 2000)	3-4 (3-4) 4 (5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки). Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях (C_{20})	C_{20} - клиника	2	Специалистам с применением СИЗ
		$C_{20} \leq Lim_{ac}$	3-4	(респираторы, защитные очки, резиновые перчатки) Специалистам и населению

			в быту
Зона острого биоцидного эффекта	< 10	1	Специалистам с применением СИЗ (противогазы/респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
	10 - 30	2	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, герметичные очки, резиновые перчатки, комбинезон и др.)
	31 - 100	3	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения (уборка, проветривание).
	> 100	4	Специалистам и населению в быту
Зона подострого биоцидного эффекта	< 1	1	Запрещены для применения в дезинсекции
	1-5	2	Специалистам для обработки производственных помещений с регламентированными условиями применения за исключением детских учреждений, МО и быта
	5,1-10	3	Специалистам и населением в быту для обработки жилых и производственных помещений с регламентированными

	> 10	4	условиями применения (уборка, проветривание, расход препарата)
			Специалистам и населению в быту
Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту
Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам и населению в быту с применением СИЗ (резиновые перчатки)
	отсутствие эффекта		Специалистам и населению в быту
Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, респираторы)
	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
Острое раздражающее действие на глаза, баллы	< 10	2-3	Специалистам с применением СИЗ (защитные очки)
	0-3	4-5	Специалистам и населению в быту
Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}>1$	2-4	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}\leq1$	2-4	
	$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}\leq1$	3-4	Специалистам в отсутствие людей
			Специалистам и населению

				в быту
1.7.5. Инсектицидные средства для импрегнации и обработки тканей	Анализ токсичности на сперматозоидах быка (вытяжка из ткани)	индекс токсичности 70-120%	Персоналу, пациентам и населению в быту	Госстандарт РФ №862-мст от 29.12.1999 Приложение А
	Кожно-резорбтивное и раздражающее действие на кожу средства и ткани (0,5-1 мес.)	отсутствие эффектов	не нормируется	Персоналу, пациентам и населению в быту

1.8. Репеллентные средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.8.1.Репеллентные средства для нанесения на кожу	Острая токсичность при нанесении на кожу, (DL_{50} мг/кг)	> 2500 (> 2000- ≤ 5000)	4 (5)	[1)]Работающему персоналу
		> 2500 (> 5000)	4 (не классифицируется)	[1)]Работающему персоналу взрослому и [2)]детскому населению
1.8.1.1. Кремы, эмульсии, лосьоны, карандаши, браслеты и др.	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг)	>150 (> 300 - ≤ 5000)	3-4 (4-5)	[1)]Работающему персоналу
		> 5000 (> 5000)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и [2)]детскому населению
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} = Lim_{ac}$	3	Работающему персоналу и взрослому населению в быту
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Работающему персоналу, взрослому и [2)]детскому населению
	Раздражающее действие на	слабое		Работающему персоналу в

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)		не классифицируется	регламентированном режиме применения
		отсутствие эффекта		Работающему персоналу, взрослому населению детскому населению
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4,0-6,0	3	Работающему персоналу
		0– 2,0	4-5	Работающему персоналу, взрослому и [2)]детскому населению
	Кожно-резорбтивное и раздражающее действие на кожу (от 1до 6 месяцев)	наличие эффекта	не классифицируется	Запрещено
		отсутствие эффекта		Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Оценка соответствия содержания ДВ средства (С) на кожу гигиеническим нормативам	$С/ПДУ(ОДУ)_{на\ кожу}$ ≤1	3-4	Работающему персоналу и населению в быту
	Клинические испытания опытной партии репеллентного средства с использованием нового ДВ	Отсутствие реакций. Отсутствие изменений по сравнению с контролем и фоном	не классифицируется	Рекомендация на производство и регистрацию средства
1.8.1.2. Аэрозольные баллоны, БАУ	Острая токсичность при нанесении на кожу (для БАУ) (DL_{50}, мг/кг).	> 2500	4	[1)]Работающему персоналу
		(> 5000)	(не классифицируется)	[1)]Работающему персоналу взрослому и [2)]детскому населению

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Острая токсичность при введении в желудок (для БАУ), (DL_{50}, мг/кг).	>150 (> 300 - ≤ 5000)	3-4 (4-5)	Работающему персоналу и взрослому населению в быту с регламентацией условий применения
		> 5000 (> 5000)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} = Lim_{ac}$	3	Работающему персоналу и взрослому населению в быту с регламентированными условиями применения.
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Работающему персоналу взрослому и детскому населению
	Зона острого биоцидного эффекта	31 - 100	3	[1)]Работающему персоналу и населению в быту с регламентированными условиями применения.
	Зона острого биоцидного эффекта (указанные «зоны» для спиртсодержащих средств уменьшается на порядок)	> 100	4	Работающему персоналу, взрослому населению в быту.
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	слабое		Работающему персоналу в регламентированном режиме применения
		отсутствие эффекта	не классифицируется	Работающему персоналу, взрослому населению. Детскому населению (для детей использовать средства с

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
				содержанием ДВ не более 12 %)
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4,0-6,0	3	Работающему персоналу
		0– 3,0	4-5	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Кожно-резорбтивное и раздражающее действие на кожу (от 4 до 6 месяцев)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Запрещены Работающему персоналу взрослому и детскому населению
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	слабое (низкое)	3В (1В)	Работающему персоналу
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.} \leq 1$ $С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.} \leq 1$ $С/ПДУ(ОДУ)_{на\ кожу} \leq 1$	2-4	Работающему персоналу и населению в быту
	Клинические испытания опытной партии репеллентного средства с использованием нового ДВ	Отсутствие реакций. Отсутствие изменений по сравнению с контролем и фоном	не классифицируется	Рекомендация на производство и регистрацию средства
1.8.2. Репеллентные средства для импрегнации	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50},	>2500 (>2000)	4 4-5	[1)]Работающему персоналу, взрослому и [2)]детскому

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
и обработки одежды и тканей, для нанесения на поверхности, покрытия (растворы, эмульсии, карандаши, и др.)	мг/кг)			населению
	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50}, мг/кг).	>150 (> 300 - ≤ 5000)	3-4 (4-5)	Работающему персоналу и взрослому населению в быту с регламентацией условий применения
		> 5000 (> 5000)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Кожно-оральный коэффициент	< 3		Работающему персоналу.
		≥ 3		Работающему персоналу, взрослому и детскому населению
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	$C_{20} = Lim_{ac}$	3	Специалистам и взрослому населению в быту с регламентированными условиями применения.
		$C_{20} > Lim_{ac}$	4	Специалистам и населению в быту
	Ингаляционная опасность паров с тканей, обработанных средствами.	наличие эффекта	3	Специалистам с регламентированными условиями применения
		отсутствие эффекта	4	Работающему персоналу, взрослому населению
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3 (3)	Специалистам с регламентированными условиями применения.
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому и детскому населению

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4,0-6,0	3	Специалистам с регламентированными условиями применения
		0– 2,0	4-5	Работающему персоналу, взрослому населению
	Кожно-резорбтивное и раздражающее действие на кожу (от 4 до 6 месяцев)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Запрещены Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	слабое (низкое)	3В 1В	Работающему персоналу
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Работающему персоналу, взрослому населению
	Анализ токсичности на сперматозоидах быка (вытяжка из ткани)	индекс токсичности 70-120%		Персоналу, пациентам и населению в быту
	Клинические испытания опытной партии репеллентного средства с использованием нового ДВ	Отсутствие реакций. Отсутствие достоверно значимых изменений по сравнению с контролем и фоном	не классифицируется	Рекомендация на производство и регистрацию средства

[1)]Работающий персонал (лесорубы, геологи, мелиораторы и др).

[2)]Репеллентные средства для детей младшего возраста (с одного года жизни и старше) должны быть только 4 класса по лимитирующим критериям (при нанесении на кожу, при ингаляции паров в насыщающих концентрациях, КВЧ – более 3), без отдаленных эффектов, при отсутствии раздражающего, резорбтивного, сенсибилизирующего и иммуномодулирующих эффектов, а также с наличием ПДУ для ДВ на кожу и с коэффициентом запаса (более 10).

1.9. Педикулицидные средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено Применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.9.1. Педикулицидные средства для борьбы с головным и лобковым педикулезом				
1.9.1.1. Средства в виде концентрата	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	>151 (> 50)	3-4 (3-5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг).	<500 (≤ 1000)	1-2 (1-3)	Запрещены
		> 2500 (> 1000)	4 (4-5)	Специалистам и населению в быту
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров (C_{20})	C_{20} – клиника		Специалистам с применением СИЗ (респиратор, защитные очки, резиновые перчатки)
		$C_{20} \geq Lim_{ac}$		Специалистам и населением в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	>4,0 (≥ 2,3)	1-2 (1-2)	Запрещены
		2,1 – 4,0 (≥ 1,5 – < 2,3)	3-4 (3)	Специалистам и населению в быту
		(< 1,5)	(не классифицируется)	
1.9.1.2. Готовые к применению формы педикулицидных средств (лосьоны, гели, шампуни, мыла, дусты или рабочие растворы)	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 300)	3-4 (4-5)	Специалистам и населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг).	< 2500 (≤ 1000)	1-3 (1-3)	Запрещены

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено Применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
		> 2500 (> 1000)	4 (4-5)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 6,0 (≥ 1,5)	2-3 (2-3)	Запрещены
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4-6	3	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения
		0-3	4-5	Без ограничений
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Запрещены Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
1.9.1.3. Аэрозольные баллоны, БАУ	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	< 2500 (≤ 2000)	1-3 (1-4)	Запрещены
		> 2500 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 6,0 (≥ 1,5)	2-3 (2-3)	Запрещены
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	4-6	3	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено Применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
		0-3	4-5	Без ограничений
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Запрещены Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Запрещены
		отсутствие эффекта (отсутствие эффекта)	4 (не классифицируется)	Без ограничений
1.9.2. Средства для борьбы с платяным педикулезом				
1.9.2.1. Готовые к применению формы педикулицидных средств (растворы, эмульсии, дусты)	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50}, мг/кг)	> 150 (> 300)	3-4 (4-5)	Специалистам и Населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50}, мг/кг)	< 2500 (≤ 2000)	1-3 (1-4)	Запрещены
		> 2500 (> 2000)	4 (5)	Специалистам и населению в быту
	Острое раздражающее/ разъедающее действие на кожу, баллы (эритема, отек)	2,1 – 6,0 (≥ 1,5)	2-3 (2-3)	Запрещены
		0 – 2,0 (< 1,5)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта отсутствие эффекта	не классифицируется	Запрещены Специалистам и населению в быту
	Сенсибилизирующее действие (кожное/респираторное)	умеренное/слабое (умеренное/низкое)	3А/3В (1В)	Специалистам с регламентированными условиями применения
		отсутствие эффекта	4	Специалистам и

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено Применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
		(отсутствие эффекта)	(не классифицируется)	населению в быту
	Ингаляционная токсичность при повторном воздействии (14 дн.)в режимах применения:		не классифицируется	
	в норме расхода	наличие эффекта		Запрещены
	в 3 нормах расхода	наличие эффекта		Специалистам с применением СИЗ (респираторы, защитные очки, резиновые перчатки)
	в 10 нормах расхода	наличие эффекта		Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения
		отсутствие эффекта		Специалистам и населением в быту
	Определение органолептических показателей материалов, импрегнированных педикулицидными средствами, в соответствии с требованиями МУК 4.1/4.31485-03 «Гигиеническая оценка одежды для детей, подростков и взрослых»	не соответствие		Применение по эпид. показаниям
		соответствие	не классифицируется	Специалистам и населению в быту

1.10. Дератизационные средства

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
1.10.1.Дератизационные средства в различных формах (пасты, гели, масляные растворы, тесто)	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50} , мг/кг)	>15 (> 5 - ≤ 2000)	2-4 (2-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Без ограничений
	Острая токсичность при нанесении на кожу, DL_{50} , мг/кг	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		> 2500 (> 2000 - ≤ 5000)	4 (5)	Без ограничений
	Кумулятивный эффект (по классификации Медведя Л.И.):			
	- антикоагулянты	≤ 3	1-2	Без ограничений
	- яды острого типа действия	> 3	3-4	Без ограничений
	Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях (C_{20})	$C_{20} \geq Lim_{ac}$	2-3	Специалистам с применением СИЗ (респираторы, резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		$C_{20} < Lim_{ac}$	4	Без ограничений
	Кожно-резорбтивное действие (21/28 дн.)	наличие эффекта	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки,

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
				комбинезон и др.)
		отсутствие эффекта		Специалистам, населению в быту
	Раздражающее действие на кожу при повторных аппликациях (0,5-1 мес.)	умеренное/слабое	не классифицируется	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, комбинезон и др.)
		отсутствие эффекта		Специалистам, населению в быту
1.10.2. Дератизационные средства в виде дустов, порошков, пудры	Острая токсичность при введении в желудок, (DL_{50} , мг/кг)	>15 (> 5 - ≤ 2000)	2-4 (2-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам, населению в быту
	Острая токсичность при нанесении на кожу (DL_{50} , мг/кг)	> 500 (> 200 - ≤ 2000)	3-4 (3-4)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		> 5000 (> 2000)	4 (5)	Специалистам, населению в быту
	Кумулятивный эффект (по классификации Медведя Л.И.):			
	- антикоагулянты	не более 3	1-2	Специалистам и населению в быту
	- яды острого типа действия	более 3	3-4	Специалистам и населению в быту

Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели		Разрешено применение
		Величина показателя	Классификационная оценка	
	Оценка соответствия содержания ДВ рабочего раствора (С) в воздухе гигиеническим нормативам (проводится при необходимости)	$С/ПДК(ОБУВ)_{р.з.}$ ≤1	2-4	Специалистам
			3-4	Населению в быту
		$С/ПДК(ОБУВ)_{а.н.м.}$ ≤1		
	Острое раздражающее действие на глаза, баллы	< 4,0	3-4	Специалистам и населению в быту с регламентированными условиями применения
		0	5	Специалистам и населению в быту
1.10.3. Дератизационные приманки (зерновые, гранулированные, блоки восковые, парафинированные и др.)	Острая токсичность при введении в желудок (DL_{50} , мг/кг)	>150 (> 300 - ≤ 5000)	3-4 (4-5)	Специалистам с применением СИЗ (резиновые перчатки, защитные очки, комбинезон и др.)
		> 5000 (> 5000)	4 (не классифицируется)	Специалистам и населению в быту
	Кумулятивный эффект (по классификации Медведя Л.И.):			
	- антикоагулянты	≤ 3	1-2	Специалистам и населению в быту
	- яды острого типа действия	> 3	3-4	Специалистам и населению в быту

Примечание к таблицам 1.1-1.10.

*Классификационная оценка - классы опасности указаны по Р 4.2.2643-10 и по ГОСТ 12.1.007-76 (действует до принятия классификации вредных веществ в соответствии с СГС). Классификация по СГС приведена в скобках.

** Специалисты: персонал, обученный в области дезинфекционной деятельности.

2. Физико-химические показатели дезинфекционных средств

2.1. Дезинфицирующие, стерилизующие средства и средства для предстерилизационной очистки

№ п/п	Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели
1	Субстанции для производства дезинфицирующих, стерилизующих средств и средств для предстерилизационной очистки	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
2	Дезинфицирующие средства в разных формах применения (жидкости, порошки, таблетки, краски, лаки, пасты, аэрозольные баллоны, гели и др)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
3	Стерилизующие средства в разных формах применения (жидкости, газы, пары, порошки и др)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
4	Средства для предстерилизационной очистки в разных формах применения (жидкости, порошки, гранулы и др)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях зарубежных фирм на продукцию

2.2. Дезинсекционные средства

№ п/п	Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели
1	Субстанции для производства инсектицидных, педикулицидных, репеллентных и акаро-инсектицидных средств	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
2	Инсектицидные средства в аэрозольных баллонах	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
3	Инсектицидные средства в других формах применения (концентраты эмульсий, смачивающиеся порошки, гели, пищевые приманки, дусты, приманки, шашки)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
4	Педикулицидные средства в разных формах применения (лосьоны, шампуни, концентраты эмульсий, мыла (твердые, жидкие), кремы	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
5	Репелленты в аэрозольных баллонах	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
6	Электрофумигирующие репеллентные средства (пластины, спирали, жидкости, свечи)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
7	Репелленты в других формах применения (лосьоны, эмульсии, гели, молочко, кремы)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей

№ п/п	Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели
8	Акаро-инсектицидные средства (аэрозольные баллоны, концентраты эмульсий, карандаши)	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей

2.3. Дератизационные средства

№ п/п	Назначение средства	Исследуемые показатели	Нормативные показатели
1	Субстанции для производства дератизационных средств	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей
2	Дератизационные средства в разных формах применения (зерновые приманки, гранулы, гели и др	Внешний вид (агрегатное состояние, цвет), запах, физико-химические показатели (водородный показатель (pH) и пр.), массовая доля действующего вещества	Установленные в ГОСТ, ТУ и спецификациях фирм-производителей

Перечень использованных сокращений

Lim_{ac} – порог острого действия;

Lim_{subac} – порог подострого действия;

C_{20} – насыщающая концентрация паров при 20^0C;

БАУ – беспропеллентная аэрозольная упаковка;

ДВ – действующее вещество;

ДОК – допустимые остаточные количества;

ДС – дезинфекционные средства;

ДСД – допустимая суточная доза;

ИМН – изделия медицинского назначения;

$К_{к/о}$ – кожно-оральный коэффициент;

$К_{кум}$ – коэффициент кумуляции (по классификации Медведя Л.И.);

$ЛД_{50}$ (DL_{50}) – средне-смертельная доза;

$ЛК_{50}$ (CL_{50}) – средне-смертельная концентрация;

МЭОК – минимальная эффективная обеззараживающая концентрация;

$ОБУВ_{а.в.}$ – ориентировочный безопасный уровень воздействия в атмосферном воздухе населенных мест;

$ОБУВ_{р.з.}$ – ориентировочный безопасный уровень воздействия в воздухе рабочей зоны;

$ОДУ_{в.}$ – ориентировочный допустимый уровень в воде водных объектах хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования;

$ОДУ_{з.к.п.}$ – ориентировочный допустимый уровень загрязнения кожных покровов;

$ПДК_{а.в.}$ – предельно допустимая концентрация в атмосферном воздухе населенных мест;

$ПДК_{басс.}$ – предельно допустимая концентрация в воде плавательных бассейнов и аквапарков;

$ПДК_{в.}$ – предельно допустимая концентрация в воде водных объектах хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования;

$ПДУ_{з.к.п.}$ – предельно допустимый уровень загрязнения кожных покровов;

$ПДК_{р.з.}$ – предельно допустимая концентрация в воздухе рабочей зоны;

СГС – Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS);

$СК_{50}$ – концентрация действующего вещества, вызывающая 50% гибели особей;

ЦТД – цитотоксическое действие.

Приложение 20.2 к разделу 20
Единых санитарно-
эпидемиологических и гигиенических
требований к продукции (товарам),
подлежащей санитарно-
эпидемиологическому надзору
(контролю)

Единые методы исследований эффективности дезинфекционных средств

Введение

Документ «Единые методы исследований эффективности дезинфекционных средств» разработан в соответствии с Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии № 35 от 19 апреля 2012 года «Об утверждении «Положения об унификации методов испытаний для целей оценки соответствия Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» с целью формирования и утверждения Единого перечня методов (методик) для целей оценки соответствия продукции Единым санитарно-гигиеническим требованиям.

Унификация методов исследований и критериев оценки эффективности дезинфекционных средств необходима для обеспечения единства требований и сравнимости результатов испытаний дезинфекционных средств различного состава при проведении дезинфектологической экспертизы с целью государственной регистрации на таможенной территории Союза, проводимой в разных странах Союза, а также обеспечения стандартизации условий

применения эквивалентных дезинфекционных средств (аналогичного состава).

В основу проекта документа по Единым методам исследований эффективности дезинфекционных средств заложены следующие принципы:

- использование только официально утвержденных методик одной из Сторон;

- взаимопризнание методов/методик, официально утвержденных сторонами;

- взаимопризнание метрологической аттестации (подтверждение пригодности) методов;

- взаимный обмен методами/методиками испытаний;

- возможность актуализации Единого перечня методов/методик и внесения в него изменений и дополнений.

Данный документ разработан на основе Руководства Р 4.2. 2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности» (М., 2010 г.), а также в соответствии с официальными национальными (государственными) методиками проведения исследований в Республике Беларусь, частично гармонизированными с Европейским союзом, а также с учетом предложений и замечаний Республики Казахстан.

Единые методы исследований эффективности дезинфекционных средств включают:

микробиологические методы исследований и критерии оценки эффективности дезинфицирующих и стерилизующих средств (в том числе методы, используемые в Республике Беларусь);

энтомологические методы исследований и критерии оценки эффективности дезинсекционных средств;

родентологические методы исследований и критерии оценки эффективности дератизационных средств.

1. Микробиологические методы исследований и критерии оценки эффективности дезинфицирующих и стерилизующих средств

Современные дезинфицирующие средства (далее - ДС) представляют собой индивидуальные химические соединения или композиционные составы, включающие одно или несколько действующих веществ (далее - ДВ). Кроме того, в их состав могут входить вспомогательные компоненты: стабилизаторы, ингибиторы коррозии, моющие вещества, красители, отдушки и др.

В качестве действующих веществ в ДС используют хлорактивные, кислородактивные соединения, альдегиды, четвертичные аммониевые соединения, амины, гуанидины, спирты и др.

ДС производятся в форме жидких концентратов, готовых к применению жидкостей, порошков, таблеток, гелей, спреев, салфеток, биоцидных лакокрасочных материалов и др.

ДС должны отвечать следующим требованиям:

– обладать достаточной антимикробной активностью в отношении патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов, а также споровых форм микроорганизмов;

– относительно низкой токсичностью для человека;

– быть экологически безопасными;

– быть стабильными при хранении;

– не иметь резкого неприятного запаха;

– хорошо растворяться в воде;

– не повреждать обрабатываемые объекты;

– иметь оптимальное соотношение стоимость-качество.

К некоторым средствам узко целевого назначения дополнительно предъявляют индивидуальные требования, изложенные в соответствующих главах.

ДС могут быть универсального назначения, которые рекомендуется применять для дезинфекции многих объектов при разных инфекциях, или узко целевого назначения, предназначенные для дезинфекции одного конкретного объекта, например, для дезинфекции стоматологических оттисков, или воздуха, или поверхностей и т.д.

Предполагаемая сфера применения ДС определяет объем микробиологических исследований, необходимых для разработки режимов обеззараживания соответствующих объектов.

Микробиологические исследования начинают только после получения результатов химико-аналитических исследований, подтверждающих соответствие средства требованиям нормативно-технической документации (НТД): технических условий – на отечественные средства, спецификации – на зарубежные.

Этапы исследований дезинфицирующих веществ и дезинфицирующих средств. Микробиологические исследования включают изучение активности ДВ и изучение эффективности ДС.

При исследовании субстанций, предназначенных для производства ДС, определяют спектр антимикробного действия в экспериментах in vitro.

Исследование свойств ДС проводят в 3 этапа:

1) определение in vitro спектра антимикробной активности ДС и влияния на нее различных факторов: pH, органических веществ, температуры.

2) эффективность обеззараживания искусственно контаминированных тест-микроорганизмами объектов в лабораторных условиях с целью разработки режимов применения ДС в зависимости от концентрации ДВ, времени воздействия, характера объекта, способа обработки и других факторов.

3) испытание ДС в практических условиях для подтверждения эффективности разработанных режимов в реальных условиях применения в случаях: исследования средства, содержащего новое ДВ; нового способа применения, значительного снижения концентрации и времени воздействия по сравнению с ранее разрешенными режимами и пр.

1.1. Методы изучения и оценки бактерицидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций

1.1.1. Тест-микроорганизмы для изучения бактерицидной активности ДС и их субстанций. Требования к тест-микроорганизмам.

При изучении бактерицидной активности дезинфицирующих субстанций и ДС в качестве тест-микроорганизмов используют:

для оценки бактерицидной активности в отношении грамотрицательных бактерий Escherichia coli (штамм 1257) *,

Escherichia coli K12 НСТС10538,

Escherichia coli ATCC 11229,

Escherichia coli (25912), Escherichia coli (35218),

Pseudomonas aeruginosa (штамм ATCC 27853),

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939),

Proteus mirabilis ATCC 14153 (ДСМ 788);

для оценки бактерицидной активности в отношении грамположительных бактерий Staphylococcus aureus (штамм 906)*,

Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799),

Staphylococcus aureus (43300),

Staphylococcus aureus (29213),

Enterococcus faecitum ATCC 6057 (ДСМ 2146),

Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320).

**) штамм используется до 01.07.2015 до получения результатов экспериментальной оценки сравнительной устойчивости с другими штаммами микроорганизма коллекции АТСС.*

При сертификационных испытаниях и экспертной оценке ДС набор тест-микроорганизмов может быть ограничен наиболее устойчивыми представителями каждой группы, который устанавливается при сравнительных испытаниях.

Перечень тест-микроорганизмов, если он шире стандартного, указан в соответствующих разделах по изучению эффективности ДС при обеззараживании отдельных объектов.

Условия культивирования тест-микроорганизмов.

Тест-микроорганизмы культивируют на следующих питательных средах:

E.coli, P.aeruginosa и S.aureus и др. – на казеиновом бульоне, мясо-пептонном бульоне, агаре Эндо, казеиновом агаре, мясо-пептонном агаре и др. при температуре плюс 37±1°С в течение 18-24 ч.

Музейные культуры указанных выше микроорганизмов хранят при температуре плюс 3±1°С в ампулах (после лиофильной сушки), на плотных питательных средах (посев уколом) под слоем стерильного вазелинового масла (толщина слоя 1,5-3 мм), в криопробирках в морозильной камере при температуре от минус 18°С до минус 70°С, а рабочие культуры – на скошенном агаре или в бульоне.

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные биохимические, морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, присущие данному виду и обладать стандартной устойчивостью к эталонным дезинфицирующим средствам: растворам хлорамина, перекиси водорода, Катамина АБ – алкилдиметилбензиламмония хлорида (АДБАХ), глутарового альдегида (таблица 1.1).

Таблица 1.1

Устойчивость тест-микроорганизмов к дезинфицирующим агентам

Дезинфицирующее вещество	Концентрация раствора по ДВ, %	Время гибели тест-микроорганизмов, мин не менее	
		E.coli, шт. 1257	S.aureus, шт. 906
Хлорамин	0,020* 0,200*	5 -	- 15
АДБАХ	0,025	20	10
Глутаровый альдегид	0,030 0,060	10 -	- 10
Перекись водорода	2,000 3,000	10 -	- 25

Примечание – знак (*) обозначает, что концентрация раствора указана по препарату.

Устойчивость тест-микроорганизмов к эталонным дезинфицирующим средствам определяют методом батистовых тест-объектов (п.1.1.2.2.)

Проверку устойчивости тест-микроорганизмов проводят не реже 1 раза в месяц. При снижении резистентности культур делают их пересевы на обогащенные питательные среды до восстановления устойчивости.

1.1.1.1. Методы приготовления суспензии тест-микроорганизмов. Определение биологической концентрации тест-микроорганизмов в бактериальной суспензии

Культуры тест-микроорганизмов подвергают контролю их качества. В частности, непосредственно перед использованием тест-культур для исследовательских целей необходимо убедиться в том, что тест-штаммы, выросшие на питательной среде, не загрязнены посторонней микрофлорой. Для оценки роста культур тест-штаммов визуально просматривают каждую пробирку и учитывают характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Проводят микроскопию мазка выросших культур, окрашенных по Грамму.

Рабочую суспензию тест-культур готовят из культуры данного тест-штамма, выращенного на плотной питательной среде (МПА или казеиновый агар) при температуре 37±1°С в течение 18-24 часов. Для приготовления бактериальной взвеси культуру смывают с агара стерильной питьевой водой. Полученную взвесь микробов фильтруют через ватно-марлевый фильтр и разводят стерильной питьевой водой до концентрации, соответствующей по мутности оптическому стандарту мутности (стандарт мутности производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, стандарт мутности по МакФарланду) $2 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл. В случае отсутствия готового стандарта мутности контроль количества микробных тел проводят с помощью денситометра.

В связи с тем, что суспензия может содержать наряду с живыми мертвые микроорганизмы, необходимо определять бактериологическую концентрацию фактического количества живых клеток в приготовленной суспензии, чтобы, при необходимости, внести

коррективы и обеспечить требуемые уровни контаминации батистовых тест-объектов жизнеспособными микроорганизмами.

Определение биологической концентрации тест-микроорганизмов выполняют методом последовательных десятикратных разведений суспензии тест-микроорганизма в стерильной питьевой воде с последующим высевом суспензии в чашки Петри с плотной питательной средой (казеиновый агар, агар Эндо, МПА). После определенного времени инкубации при соответствующей температуре проводят подсчет выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяют количество жизнеспособных бактерий в одном мл суспензии.

Из практики известно, что суспензия, содержащая такое количество живых микробов, при контаминации ею батистовых тест-объектов обеспечивает требуемые (порядка $1 \cdot 10^5$-$1 \cdot 10^6$ КОЕ/см^2) уровни их обсеменения живыми клетками тест-микроба.

1.1.1.2. Приготовление рабочих растворов ДС и их субстанций

Рабочие растворы ДС и их субстанций готовят непосредственно перед проведением исследований (кроме тех случаев, когда изучают стабильность рабочих растворов в процессе хранения).

При изучении средств, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и др., рабочие растворы используют только после полного растворения ДВ дезинфицирующего средства (если не указано на возможность выпадения осадка).

Для оценки антимикробного действия субстанций и ДС в лабораторных условиях и исследования эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания различных объектов растворы готовят на питьевой воде. Для этого необходимое количество сухого ДС

или жидкого концентрата вносят в пробирку (колбу) и добавляют расчетное количество воды, тщательно размешивают и закрывают пробкой. Отмечают время полного растворения и внешний вид приготовленного рабочего раствора.

Температура растворов ДС должна быть в пределах плюс 20±2°С (если по условиям эксперимента не рекомендована другая температура) независимо от температуры окружающей среды. Для поддержания требуемой температуры используют водяную баню.

При испытании ДС в практических условиях рабочие растворы готовят на питьевой воде комнатной температуры (плюс 20±2°С) или, при необходимости, умеренно повышенной температуры (плюс 45-50°С). Навеску средства или отмеренное количество жидкого концентрата вносят в соответствующую емкость, добавляют воду, размешивают и закрывают крышкой. Работу с раствором начинают после полного растворения ДВ. Рабочие растворы из ДС в форме таблеток готовят путем добавления в отмеренный объем воды определенного числа таблеток.

Рабочие растворы субстанций и ДС готовят с соблюдением мер предосторожности. Если ДВ относится к летучим веществам и представляет опасность при ингаляционном воздействии, растворы готовят в вытяжном шкафу или в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией в респираторе РУ-60М или РПГ-67 или другие предназначенные для работы с химическими соединениями, кожу рук защищают резиновыми перчатками, глаза - защитными очками.

Исследуемые ДС следует хранить в соответствии с требованиями технических условий или спецификации; при отсутствии таковых – в соответствии с СП 3.5. 1378-03.

1.1.2. Методы исследований и оценки результатов бактерицидной активности ДС и их субстанций in vitro

Целью исследований является определение уровня и спектра антимикробной активности ДС и их субстанций.

Субстанции, предназначенные для производства ДС, должны соответствовать следующим требованиям:

хорошо растворяться в воде или других растворителях;

обладать бактерицидной активностью, т.е. убивать бактерии, а не задерживать их рост;

иметь удовлетворительные органолептические (по цвету, запаху) и физико-химические (по растворимости, биоразлагаемости и стабильности при хранении и др.) свойства.

Антимикробную активность ДС и их субстанций изучают суспензионным методом или методом батистовых тест-объектов.

1.1.2.1 Качественный суспензионный метод

Для приготовления растворов ДС в различных концентрациях ДВ разводят или растворяют в питьевой воде, далее по 4,5 мл разливают в стерильные пробирки, в которые добавляют 0,5 мл взвеси тест-микроорганизма или бульонной культуры, содержащей $1 \cdot 10^9$ мк/мл, и тщательно перемешивают. Через определенные интервалы времени (5 мин.) по 0,5 мл взвеси «тест-микроорганизм+ДВ» добавляют к 4,5 мл соответствующего нейтрализатора, снова тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем по 0,5 мл вносят в пробирку с 4,5 мл стерильной питьевой воды, после чего 0,1 мл из этой пробы вносят в пробирки с 5 мл жидкой и на поверхность твердой питательной среды. В контрольных опытах вместо растворов ДС используют стерильную

питьевую воду, а посевы делают в среду без нейтрализации или с нейтрализацией.

Температура инкубирования посевов в термостате 37±1°С, сроки учета результатов опыта – 24-48 часов. Для подтверждения снятия биоцидного действия ДВ из пробирок, в которых отсутствовал рост тест-культуры, ежедневно делают пересев по 0,5 мл в 4,5 мл новой питательной среды.

Результаты опыта оценивают по наличию или отсутствию роста микроорганизмов в жидкой и на твердой питательной среде. Сравнение проводят с контролем опыта, которым является посев тест-микроорганизмов в питательную среду без добавления ДС или субстанции.

Эффективной считают концентрацию средства, при которой трижды повторенный опыт при определенном времени воздействия дает отрицательный результат (отсутствие роста микроорганизмов) при наличии типичного роста тест-культуры в контроле.

1.1.2.2 Метод батистовых тест-объектов

Подготовка батистовых тест-объектов.

Перед приготовлением батистовых тест-объектов кусок батиста погружают на 24 часа в холодную воду для удаления аплитуры, крахмала. Затем его тщательно стирают с мылом, кипятят, сушат и гладят утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 11 мм друг от друга, а в поперечном – на расстоянии 6 мм. По этим линиям батист разрезают ножницами на тест-объекты и по 50 штук раскладывают в чашки Петри, последние заворачивают в бумагу и стерилизуют паровым методом при плюс 132°С (2,0 кГс/см^2) 20 мин.

Контаминация батистовых тест-объектов.

Приготовление суспензии тест-микроорганизмов (E.coli, S.aureus, P.aeruginosa и др.) проводят в соответствии с п. 1.1.1.1. Для контаминации стерильные батистовые тест-объекты в чашке Петри заливают суспензией тест-микроорганизма из расчета 0,5 мл на 1 тест-объект, равномерно смачивая все тест-объекты. Чашку Петри закрывают крышкой и оставляют на 20 мин. Затем, в асептических условиях батистовые тест-объекты, пропитанные суспензией тест-микроорганизмов, переносят на поверхность стерильной фильтровальной бумаги (2-4 слоя на дне чашки Петри), прикрывают их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывают чашку Петри крышкой. Через 10 мин. после удаления избытка жидкости тест-объекты переносят на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывают стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивают в термостате при температуре плюс 37°С в течение 20 мин. с приоткрытой крышкой.

Хранят контаминированные батистовые тест-объекты в чашках Петри в холодильнике при температуре плюс 4°С.

Срок хранения тест-объектов, контаминированных E.coli, P.aeruginosa и др. – 1 сут., S.aureus – 4 сут.

Постановка опыта.

При постановке опытов в стерильную пробирку пипеткой наливают требуемый объем приготовленного дезинфицирующего раствора (из расчета 0,5 мл на каждый тест-объект) и, не касаясь краев колбы, опускают в него с помощью стерильного пинцета все тест-объекты, используемые в эксперименте (по 2 на каждую экспозицию). Легким покачиванием колбы достигают смачивания тест-объектов исследуемым раствором. Колбу помещают в водяную баню с

температурой плюс 18-20°С и поддерживают данную температуру в течение всего эксперимента. При постоянной температуре в помещении плюс 18-20°С эксперименты можно проводить без использования водяной бани.

Отсчет времени воздействия эталонного раствора начинают с момента смачивания всех тест-объектов раствором. Через определенные интервалы времени (5 мин.) стерильным пинцетом или платиновой петлей извлекают по 2 тест-объекта из раствора и погружают в пробирки с 5 мл стерильного раствора соответствующего нейтрализатора. Через 5 мин. тест-объекты переносят в пробирку со стерильной питьевой водой, а еще через 5 мин. каждый из двух тест-объектов в отдельности переносят в пробирки с жидкой питательной средой, необходимой для культивирования изучаемого тест-микроорганизма.

Контролем являются 2 тест-объекта, погруженные на весь период эксперимента в раствор нейтрализатора, и 2 тест-объекта, погруженные на этот же срок в питьевую воду, которые по окончании эксперимента переносят в питательную среду. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С. Результаты оценивают качественно по отсутствию/наличию роста тест-микроорганизма в питательном бульоне.

Критерием активности ДС и субстанций является 100% гибель тест-микроорганизмов (отсутствие роста в опытных пробах) при времени дезинфекционной выдержки S.aureus, E.coli, P.aeruginosa и др. не более 30 мин.

1.1.2.3 Методы исключения бактериостатического действия действующих веществ

Для определения микробоцидного и исключения бактериостатического действия ДВ по истечении экспозиции необходимо прекратить воздействие ДВ на тест-культуру.

Это достигается путем использования следующих методов:

применения химического нейтрализатора;

посева в большой объем питательной среды;

ежедневного пересева на новые питательные среды;

применение химического нейтрализатора действующего вещества.

Для нейтрализации действующего вещества, 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. Тест-объекты после воздействия химического агента промывают в нейтрализаторе или добавляют его непосредственно в питательную среду (если установлено, что вносимая концентрация нейтрализатора не убивает и не задерживает рост тест-бактерий).

В качестве нейтрализаторов ДВ из различных химических групп применяют для:

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

четвертичных аммониевых солей (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.), производные гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.) – 0,1-1,0% растворы лаурилсульфата натрия

(сульфонол) или растворы лаурилсульфата натрия с 10% обезжиренного молока или универсальный нейтрализатор (см. ниже);

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

кислот – щелочи в эквивалентном количестве;

щелочей – кислоты в эквивалентном количестве;

спиртов – разведение в воде до не действующей концентрации;

композиционных средств – универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3-3%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%). Если в состав композиции входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия.

Методика контроля полноты нейтрализации действующего вещества с использованием культуры бактерий. В целях сокращения времени на подбор оптимального нейтрализатора, а также объективного подтверждения того, что ДВ, входящие в состав субстанции или ДС, полностью нейтрализованы, используют культуру бактерий, чувствительную к исследуемому ДВ.

Поэтому каждый случай проведения испытания ДС должен предварительно сопровождаться экспериментальным контролем эффективности нейтрализации остаточного действия ДС на микробную клетку, а также на бактерицидное и бактериостатическое действие используемой концентрации нейтрализатора.

Для контроля эффективности нейтрализатора и полноты нейтрализации ДС используют суспензионный метод, предусматривающий проведение исследования, основные операции которого и их назначение приведены на схеме 1.1 и в таблице 1.2.

Схема 1.1.

Проведение эксперимента по контролю эффективности нейтрализации действия ДС на E.coli используемым нейтрализатором

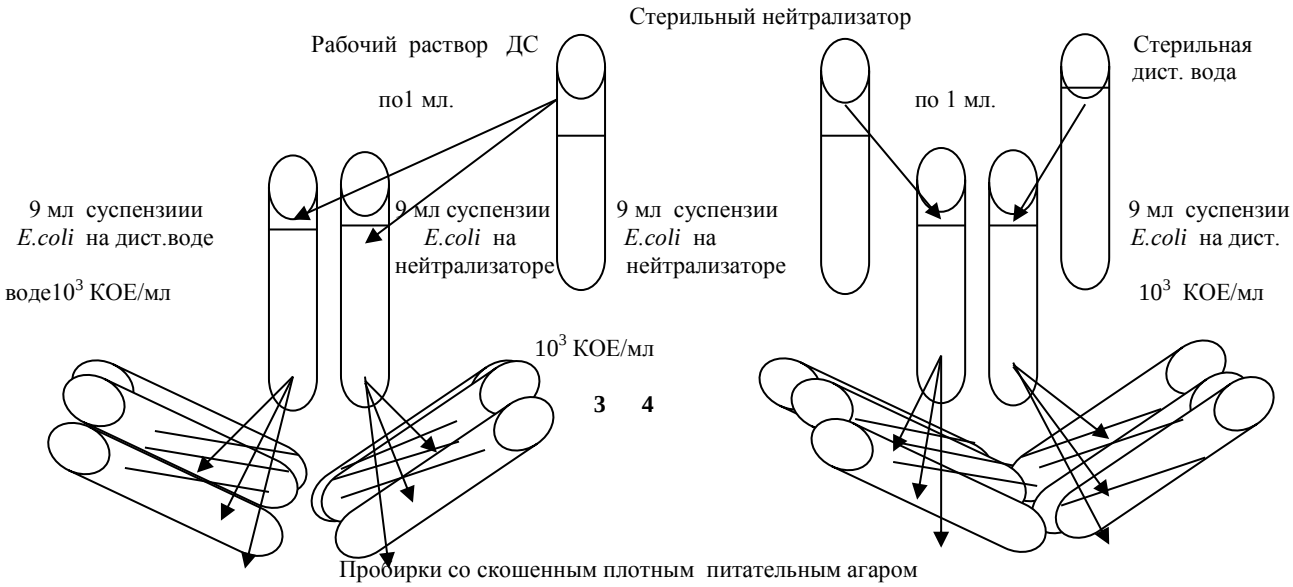


Таблица 1.2.

Назначение операций эксперимента по оценке эффективности нейтрализации остаточного действия ДС

№ пробы	Назначение операции исследования	Процедура выполнения операции исследования	Ожидаемый результат
1	Контроль губительного действия ДС	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на дист.воде + 1 мл раствора ДС	Рост микроорганизмов должен отсутствовать
2	Контроль полноты нейтрализации ДС	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора ДС	Примерно одинаковое количество колоний в посевах проб (по 0,1 мл) на плотной питательной среде
3	Контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора нейтрализатора	
4	Референс - контроль количества бактерий (*E.coli*)	к 9 мл суспензии тест-культуры (10^3 КОЕ/мл) на д.в. + 1 мл дист.воды	
Примечание: спустя 5 минут после постановки опыта, из каждой из четырех проб производят посев смеси по 0,1 мл, как минимум, на 3 пробирки со скошенной питательной средой, которые инкубируют в термостате при 37^0С, по истечении 2-3 суток учитывают результаты исследований.			

Критерии отбора действующих веществ (субстанций).

Критерием отбора действующего вещества в качестве субстанции для создания ДС является наличие у него бактерицидной активности.

Гибель тест-микроорганизмов должна составлять 100% при времени действия (мин.) ДС в минимальной концентрации в отношении бактерий не более 30 мин.

1.1.2.4 Методы изучения факторов, влияющих на бактерицидную активность ДС и их субстанций

Исследования включают определение спектра антимикробного действия ДС, а при проведении углубленного изучения – дополнительно, влияние различных факторов (pH, температура, органические вещества) на антимикробную активность растворов ДС. Такая необходимость возникает при изучении ДС, созданных на основе нового, ранее не изученного ДВ.

Изучение спектра антимикробной активности и влияние на активность различных факторов проводят методом батистовых тест-объектов (п.1.1.2.2.), контаминированных тест-микроорганизмами.

Изучение зависимости активности ДС от присутствия органических веществ проводят при добавлении к суспензии микроорганизмов 20% инактивированной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота при контаминации батистовых тест-объектов.

Для инактивации нормальной сыворотки ее прогревают на водяной бане при температуре плюс 56°С в течение 30 мин.

Испытание бактерицидной активности ДС в присутствии органических веществ проводят с теми концентрациями, которые

оказались эффективными при обеззараживании тест-объектов, контаминированных тест-микроорганизмами без добавления сыворотки.

Если активность средства при таких условиях эксперимента не снижается, концентрацию сыворотки увеличивают до 40%. При отсутствии снижения активности ДС и при добавлении 40% белка считают, что в присутствии белка активность средства не снижается.

Влияние температуры на активность исследуемого ДС изучают при обеззараживании контаминированных батистовых тест-объектов растворами средств при различных температурах растворов (от минус 30 до плюс 50°С). Для этого колбу с исследуемым раствором ДС помещают в водяную баню или холодильную камеру и устанавливают необходимую температуру. Температуру раствора доводят до желаемого уровня и опускают в него контаминированные тест-микроорганизмами батистовые тест-объекты. Далее порядок проведения опыта такой, как при изучении спектра антимикробного действия субстанций (п. 1.1.2.2.). Температуру поддерживают в течение заданной экспозиции. Если эффективная концентрация одинаковая при температуре растворов плюс 18-20°С и других значениях, то считают, что температура не влияет на активность ДС и соответственно, если эффективная концентрация увеличивается или уменьшается, то считают, что с повышением или понижением температуры эффективность ДС снижается или повышается.

Изучение влияния pH среды на активность исследуемого ДС изучают при обеззараживании контаминированных тест-микроорганизмами батистовых тест-объектов в растворах ДС, имеющих различное значение pH. Готовят ряд разведений исследуемого вещества искусственно подкисляя или подщелачивая растворы. Для подкисления используют децинормальный раствор соляной или другой кислоты, а

для подщелачивания – децинормальный раствор щелочи. Порядок проведения опыта такой же, как при оценке спектра антимикробного действия субстанций (п.1.1.2.2.).

Влияние факторов среды на активность ДС учитывается при разработке оптимальных режимов и применении ДС в практике.

1.1.3 Методы исследования бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами

Цель исследования - разработка режимов применения ДС с учетом условий их дальнейшего применения в практике для обеззараживании медицинских изделий (МИ), предметов ухода за больными, игрушек, белья, поверхностей, посуды, выделений и пр., в зависимости от вида контаминации, концентрации действующего вещества, времени воздействия, нормы расхода, характера объекта, наличия на нем органического загрязнения и его специфики, температуры, способа и кратности обработки.

1.1.3.1 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий

При выборе ДС для исследований с указанной целью следует учитывать:

назначение и кратность применения медицинских изделий (многократного или однократного применения);

наличие у ДС негативных свойств, например, корродирующего или фиксирующего действия и др., ограничивающих возможности его использования или требующих индивидуального методического подхода при исследовании;

материал (материалы), из которого изготовлено медицинское изделие;

функциональные особенности изделия и условия его эксплуатации, обуславливающие особенности методики проведения эксперимента и последующих рекомендаций по технологии их обеззараживания.

Исследование эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий из различных материалов (кроме эндоскопов). В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и медицинские изделия (катетеры, микропипетки, пластмассовые шпатели и др.) из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их тест-объекты. Перечень инструментов, взятых в эксперимент, должен включать не менее трех инструментов, имеющих замковые части (щипцы, ножницы, корнцанг) и не менее двух, не имеющих замковых частей (пинцеты, шпатели), а также стоматологические, в том числе вращающиеся, инструменты не менее двух (бор, бурав корневой, зеркало, диск шлифовальный). В качестве тест-изделий из резин, стекла, пластмасс используют фрагменты изделий (катетеры, микропипетки, шпатели и пр.).

В качестве тест-микроорганизмов используют S.aureus, P.aeruginosa. 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 мл 1 млрд. суспензии того или иного вида тест-микроорганизмов, содержащей 40% инактивированной лошадиной сыворотки. Тест-изделия подсушивают до полного высыхания. Мелкие тест-изделия погружают в указанную взвесь тест-микроорганизмов на 15 мин., затем их извлекают и подсушивают (до полного высыхания). При испытании ДС,

обладающих фиксирующими свойствами, количество добавляемой сыворотки уменьшают до 5%.

Дезинфицирующие растворы готовят на питьевой 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 воду.

Через определенное время (от 5 до 120 мин.) изделия извлекают из дезинфицирующего раствора и марлевой салфеткой размером 5х5 $см^2$, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, затем салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора и встряхивают с бусами в течение 5-10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора. Мелкие изделия погружают в раствор нейтрализатора на 5 мин., а затем переносят в пробирки с жидкой питательной средой. Для контроля эффективности обеззараживания смывную жидкость с поверхности изделия и из канала засевают на соответствующие питательные среды. Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста использованного тест-микроорганизма.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех изделиях.

При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая концентрацию или время воздействия.

Критерий эффективности обеззараживания – 100% гибель тест-микроорганизма.

Время обеззараживания медицинских изделий, контаминированных S.aureus, P. aeruginosa – не более 60 мин.

Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов, включая дезинфекцию высокого уровня.

В качестве тест-объектов используют стерильные фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий – гастроскоп, жесткий – цистоскоп), а в качестве тест-микроорганизма - S.aureus, P.aeruginosa.

На наружную поверхность тест-объекта наносят по 0,1 мл 1млрд. суспензии тест-микроорганизма, содержащей 5% сыворотки; через канал эндоскопа с помощью пипетки пропускают не менее 5 мл такой же суспензии. После этого эндоскоп подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя полости и каналы эндоскопа. Через определенные интервалы времени в течение 5-60 мин. изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой, смоченной в растворе нейтрализатора. Канал изделия промывают нейтрализатором. Смывную жидкость засевают на соответствующие питательные среды.

Критерий эффективности обеззараживания эндоскопов – 100% гибель тест-микроорганизма. Время обеззараживания эндоскопов, контаминированных S.aureus, P.aeruginosa – не более 60 мин.

1.1.3.2 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания стоматологических оттисков.

ДС, предназначенное для обеззараживания стоматологических оттисков, должно иметь широкий спектр антимикробной активности, не вызывать изменений свойств и размеров оттисков, иметь короткое время дезинфекционной выдержки (не более 30 мин.).

При разработке режимов обеззараживания стоматологических оттисков в качестве тест-микроорганизмов используют S.aureus, P.aeruginosa, в качестве тест-объектов – оттиски из альгинатных, силиконовых или других материалов. Для изготовления оттисков слепочную массу, полученную в соответствии с рекомендациями изготовителя, помещают в пластмассовую или металлическую ложку и делают оттиск с пластмассовых зубных протезов с моделированной десной. На оттиски наносят по 0,1 мл 1 мрлд. суспензии тест-микроорганизма (с добавлением 40% инактивированной сыворотки), подсушивают их в течение 2-3 мин., затем полностью погружают в раствор ДС. При установленном фиксирующем действии ДС оттиски перед погружением в дезинфицирующий раствор промывают проточной питьевой водой. Параллельно для контроля контаминированные оттиски погружают в воду. Через определенное время (5-30 мин.) оттиски извлекают из раствора и марлевой салфеткой, пропитанной нейтрализатором, делают смывы. Салфетки помещают в стерильные пробирки с бусами, содержащие 10 мл нейтрализатора, и встряхивают в течение 10 мин. Затем делают посев смывной жидкости на питательные среды для контроля эффективности обеззараживания. Критерий эффективности обеззараживания – 100%.

1.1.3.3 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания предметов ухода за больными, игрушек

В качестве тест-объектов используют предметы ухода за больными (подкладные клеенки, резиновые грелки, судна, термометры, пластмассовые наконечники для клизм и др.), игрушки (пластмассовые, металлические, деревянные, резиновые, кроме мягких) или тест-объекты, их имитирующие. В качестве тест-культур используют S.aureus, E.coli и др.

Перед контаминацией тест-микроорганизмами тест-объекты подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой. Для имитации загрязнения используется 40% инактивированной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. Для этого перед контаминацией объектов к суспензии тест-микроорганизмов добавляют необходимое количество сыворотки.

После подсушивания контаминированные тест-объекты располагают горизонтально и на них пипеткой наносят взвесь тест-микроорганизмов из расчета 0,5 мл 2 млрд. микробной взвеси на площадь в 100 $см^2$. Суспензию равномерно распределяют по поверхности тест-объектов стеклянным шпателем, подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре плюс 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором.

Обработку предметов ухода за больными и игрушек проводят способами протирания, погружения, а для крупных игрушек – способом орошения (капельное).

Норму расхода дезинфицирующего раствора при обеззараживании способами протирания или орошения определяют в зависимости от

способа обработки аналогично опытам по обеззараживанию поверхностей (п. 5.1.3.5.). Двукратное протирание или орошение проводят через 5-15 мин. после первого.

При обработке способом погружения в дезинфицирующий раствор предметов ухода за больными и мелких игрушек последний должен полностью и с избытком покрывать все объекты. При погружении мелких игрушек необходимо препятствовать их всплытию.

Время обеззараживания объектов определяют в интервале от 15 до 120 мин. в зависимости от вида тест-микроорганизма и наличия органического загрязнения.

Контрольные тест-объекты обрабатывают стерильной питьевой водой из того же расчета, что и опытные.

Контроль эффективности обеззараживания контаминированных тест-объектов проводят следующим образом: марлевой салфеткой (размером 5х5 $см^2$), смоченной в растворе нейтрализатора соответствующего для данного ДС, тщательно протирают тест-объект и погружают ее в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин. при постоянном встряхивании. Отмывную жидкость сеют на 2-3 чашки по 0,2-0,5 мл в каждую на твердые питательные среды.

Посевы помещают в термостат при температуре плюс 37±1°С и учитывают результаты через 2 суток.

Критерий эффективности обеззараживания – не менее 100%.

Время обеззараживания (мин.) объектов, контаминированных S.aureus, E.coli и др.i – не более 60 мин.

1.1.3.4 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания белья

Эффективность обеззараживания белья ДС определяют с помощью тест-объектов, представляющих собой кусочки ткани из бязи размером 2х2 см. В качестве тест-культур используют S.aureus, E.coli и др.

При разработке режима обеззараживания загрязненного белья к суспензии микроорганизмов перед контаминацией тест-объектов добавляют 40% инактивированной сыворотки (6 мл 2-х млрд. взвеси тест-культуры смешивают с 4 мл инактивированной сыворотки) или 40% фекальной эмульсии (6 мл 2-х млрд. взвеси тест-культуры смешивают с 4 мл фекальной эмульсии). Для приготовления фекальной эмульсии 8 г фекалий растирают в ступке с 20 мл воды. Контаминированные тест-объекты подсушивают в термостате при плюс 37±1°С в течение 20-25 мин. или 1,5-2 часа при комнатной температуре до полного высыхания.

Стерильные тест-объекты пропитывают 2-х млрд. взвесью тест-микроорганизмов из расчета 20 мл на 10 тест-объектов и подсушивают в термостате. Далее контаминированные тест-объекты помещают в стерильные бязевые мешочки размером 5х8 см по 2 штуки в каждый.

При разработке режимов обеззараживания белья, не загрязненного выделениями, белье погружают в емкость с дезинфицирующим раствором из расчета 4 л раствора на 1 кг сухого белья. При разработке режимов обеззараживания белья, загрязненного выделениями, его погружают в емкость с дезинфицирующим раствором из расчета 5 л раствора на 1 кг сухого белья. Белье погружают в раствор последовательно, одну вещь за другой, следя за тем, чтобы между вещами не образовывалось воздушных полостей, препятствующих

процессу дезинфекции. Мешочки с контаминированными тест-объектами распределяют между слоями белья (сверху, в середине, внизу). Через заданное время воздействия ДС (например, 15, 30, 60 мин.) извлекают по 1 мешочку с каждого уровня, стерильным пинцетом вынимают тест-объекты, переносят их в раствор нейтрализатора на 5 мин., затем промывают 5 мин. в стерильной питьевой воде, затем помещают в жидкие питательные среды. В контрольных опытах вместо дезинфицирующего раствора используют стерильную питьевую воду.

Критерий эффективности – 100% гибель тест-культуры.

Время обеззараживания (мин.) белья без видимых загрязнений, контаминированного S.aureus, E.coli и др. – не более 120 мин.

Время обеззараживания (мин.) белья, загрязненного выделениями и контаминированного S.aureus, E.coli и др. – не более 240 мин.

1.1.3.5 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей

Исследования проводят в зависимости от вида поверхностей, их положения (горизонтальное, вертикальное), способа и кратности обработки.

В качестве тест-поверхностей используют поверхности размером 10х10 см из различных материалов: гладкие, шероховатые, впитывающие и не впитывающие (деревянные, оштукатуренные, поверхности, окрашенные масляной, силикатной, водоэмульсионной или клеевой краской; оклеенные обоями, поверхности из линолеумных покрытий, поверхности из окрашенного или неокрашенного металла – нержавеющая хром – никелевая кислотостойкая сталь, пластика, стекла, искусственной или натуральной кожи, поверхности из облицовочной плитки – кафельной и метлахской, фаянса и др.), но не менее 5 видов

поверхностей. Набор тест-поверхностей для исследований определяется назначением средства.

В качестве тест-микроорганизмов используют S.aureus, E.coli и др.

При разработке режима обеззараживания технологического оборудования и поверхностей в помещениях в различных отраслях пищевой промышленности в качестве тест-поверхностей используют неокрашенный металл, пластик, облицовочную плитку (кафельная, метлахская, фаянсовая), контаминированные санитарно-показательными и специфическими для предприятий данного вида промышленности микроорганизмами.

Перед контаминацией тест-культурой поверхности подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой (за исключением поверхностей, оклеенных обоями и окрашенных клеевой краской). Последние протирают несколько раз стерильной салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой.

Высушенные поверхности располагают горизонтально и на них пипеткой наносят взвесь тест-микроорганизмов из расчета 0,5 мл 2 млрд. микробной взвеси на площадь в 100 $см^2$ и равномерно распределяют ее по поверхности стеклянным шпателем. Поверхности подсушивают (до полного высыхания) при температуре плюс 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором.

При изучении эффективности обеззараживания линолеум, плитку метлахскую, искусственную или натуральную кожу, стекло располагают горизонтально, а дерево, окрашенное масляной, силикатной, водоэмульсионной или клеевой красками, поверхности, оклеенные обоями, пластик, кафельную и фаянсовую плитки – вертикально.

Для имитации загрязнения поверхностей используют белковое или фекальное загрязнение: 40% инактивированной сыворотки, 40% фекальная эмульсия (при разработке режимов обеззараживания унитазов).

Обработку поверхностей проводят способами протирания или орошения (крупнокапельное и аэрозольное).

Для определения нормы расхода при однократной обработке дезинфицирующий раствор наносят с помощью пипетки на поверхность размером 10х10 см при применении способа протирания в количестве 1,0, 1,5 или 2,0 мл, а при крупнокапельном орошении наносят с помощью дозатора 1,5-3,0 мл. При аэрозольном методе обработки изучают эффективность обеззараживания при норме расхода 30-50-100 мл/м^2 (в зависимости от вида аэрозольного генератора и применяемой аэрозольной насадки). Многократное протирание или орошение проводят с интервалом между обработками 5-15-30 мин.

Время обеззараживания поверхностей определяют в интервале от 5 до 120 мин. Выбор экспозиции зависит от назначения и рекомендуемых условий применения ДС.

Контрольные поверхности обрабатывают стерильной питьевой водой также и из того же расчета, что и опытные.

Исследования проводят при температуре плюс 18-20°С. При необходимости оценивают эффективность обеззараживания поверхностей при повышенной до плюс 50°С или пониженной до минус 30°С температуре (исследования проводят в термо- или холодильной камере).

Контроль эффективности обеззараживания тест-поверхностей проводят следующим образом: марлевой салфеткой (размером 5х5 см), смоченной в растворе соответствующего для данного

дезинфицирующего средства нейтрализатора, тщательно протирают тест-поверхность, затем ее погружают в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин. при постоянном встряхивании. Отмывную жидкость сеют (на 2-3 чашки по 0,1-0,2 мл в каждую) на твердые дифференциально-диагностические питательные среды.

В зависимости от вида тест-микроорганизма посевы выращивают в термостате при температуре плюс 37±1°С. Учет результатов проводят в течение 1-2 суток путем подсчета количества выросших колоний, затем рассчитывают плотность контаминации 100 $см^2$ поверхности и % обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%.

Критерий эффективности обеззараживания поверхностей – не менее 99,99% гибели тест-микроорганизмов; время обеззараживания (мин) при контаминации S.aureus, E.coli и др. – не более 120 мин.

1.1.3.6. Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды

В зависимости от назначения ДС исследования проводят при обеззараживании посуды столовой и кухонной, лабораторной и из-под выделений.

В качестве тест-объектов при разработке режимов обеззараживания столовой и кухонной посуды используют тарелки, стаканы, кружки из различных материалов (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью) и столовые приборы – ножи, вилки, ложки из различных материалов (нержавеющая сталь, алюминий, пластик); лабораторной посуды – предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического

анализа и др.; посуды из-под выделений – подкладные судна, мочеприемники, горшки, плевательницы и др. или тест-объекты их имитирующие. В качестве тест-микроорганизмов при контаминации столовой посуды используют S.aureus, E.coli и др.

Для имитации загрязнения лабораторной посуды используют 40% инактивированной сыворотки; посуды из-под выделений – 40% фекальную эмульсию или мокроту, контаминированные тест-микроорганизмами (на 10 мл – 1 мл $2 \cdot 10^9$ млрд. взвеси).

Перед контаминацией микроорганизмами посуду и столовые приборы подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой. Посуду располагают горизонтально и на нее пипеткой наносят взвесь тест-микроорганизмов из расчета 0,5 мл 2 млрд. взвеси на площадь в 100 $см^2$ и равномерно распределяют ее по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы для контаминации погружают в бактериальную суспензию на 1-2 мин., оставляя незараженными их ручки.

Посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре плюс 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором.

Для разработки режимов обеззараживания посуды с остатками пищи до ее контаминации микробную взвесь смешивают с овсяной, манной или другой кашей, сваренной на молоке со сливочным маслом (к 10 г каши добавляют 1 мл 2-х млрд. микробной взвеси).

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды и столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор. Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора плюс 18-20°С. При необходимости изучают эффективность растворов, имеющих температуру плюс 50°С.

Контролем служит аналогично контаминированная посуда, которую погружают в такой же объем питьевой воды.

Дезинфицирующий раствор должен полностью и с избытком покрыть всю посуду и приборы (из расчета не менее 2 л на 1 комплект).

Через определенные интервалы времени (например, 15, 30, 60 мин. и т.д.) извлекают из дезинфицирующего раствора по одному предмету (например, тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т.д.) и стерильной марлевой салфеткой (размер 5х5 см), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС; тщательно протирают зараженную часть каждого предмета, погружают салфетку в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин. при постоянном встряхивании. После отмыва марлевую салфетку погружают в соответствующую жидкую питательную среду. Отмывную жидкость сеют на 2-3 чашки по 0,2-0,5 мл в каждую на твердые питательные среды.

Посевы помещают в термостат при температуре плюс 37°С и учитывают через 2 суток.

Время обеззараживания посуды определяют в интервале от 15 до 240 мин. в зависимости от вида тест-микроорганизма и наличия загрязнения.

Критерий эффективности обеззараживания – не менее 100%.

Время обеззараживания столовой посуды без остатков пищи, контаминированной: S.aureus, E.coli и др. – не более 60 мин.

Время обеззараживания посуды с остатками пищи, контаминированной S.aureus, E.coli и др. – не более 120 мин.

Время обеззараживания лабораторной посуды, контаминированной S.aureus, E.coli и др. – не более 120 мин.

Время обеззараживания посуды из-под выделений, контаминированной E.coli, S.typhimurium – не более 120 мин.

1.1.3.7 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений

Дезинфицирующие средства, предназначенные для обеззараживания выделений, должны обладать способностью гомогенизировать органический субстрат (фекалии, мокрота). Препараты, не обладающие этим свойством, для обеззараживания выделений не пригодны.

Изучение активности ДС при обработке выделений проводят с учетом их консистенции и соотношения с дезинфицирующим раствором или сухим препаратом.

В качестве тест-микроорганизмов при разработке режимов обеззараживания выделений используют S.aureus, E.coli и др.

Определение эффективности ДС при обработке мочи проводят следующим образом: берут несколько пробирок, наливают в них по 9 мл мочи, прибавляют по 1 мл взвеси тест-микроорганизма, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Неразведенное ДС или его растворы добавляют к моче в различных соотношениях (равном, двойном и т.д.). По истечении времени воздействия (15, 30, 60, 90, 120 мин.) пипеткой берут 1 мл опытной смеси и переносят в нейтрализатор объемом 9 мл, а затем из нее 1 мл смеси в пробирку с 5 мл бульона. После тщательного перемешивания 1 мл переносят во вторую пробирку с бульоном, а затем делают посевы по 0,1 мл на твердые питательные среды, как из первой, так и из второй пробирок. Чашки Петри с посевами ставят в термостат.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к моче не дезинфицирующего раствора, а питьевой воды.

Эффективным считают ДС, обеспечивающее 100% гибель тест-микроорганизмов в 6-8 опытах с совпадающими результатами.

Определение эффективности ДС при обработке фекалий: 20 г фекалий растирают в ступке и добавляют 80 мл стерильной питьевой воды. Полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, разливают в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл взвеси тест-микроорганизмов, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным количеством дезинфицирующего раствора или вносят различное количество сухого препарата. После контакта с ДС производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через 2 суток.

При положительных результатах проводят опыты с большим количеством оформленных фекалий (200-250 г). Для этого помещают их в сосуд и заливают дезинфицирующим раствором в равном или двойном количестве по отношению к весу фекалий или засыпают сухим препаратом. Затем небольшую часть фекальных масс стеклянной палочкой перемешивают с жидкостью, а остальную массу оставляют в виде небольших комочков. Через определенные промежутки времени (30, 60, 90 и 120 мин.) проводят раздельные высевы жидкой части и комочков.

Жидкую часть фекальных масс набирают пипеткой и производят посев так же, как мочи. Плотные части фекалий забирают петлей и опускают в 5 мл питательной среды, растерев их о край пробирки и тщательно перемешав с бульоном; затем переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, также содержащую 5 мл бульона. Как из первой, так и из второй пробирки производят посев по 0,1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к фекальной эмульсии стерильной воды вместо ДС.

Об эффективности исследуемого ДС судят на основании 6-8 опытов с совпадающими результатами. Эффективным считают ДС, обеспечивающее 100% гибель тест-микроорганизмов в обеззараживаемом материале.

При определении эффективности ДС при обработке фекально-мочевой взвеси с целью снижения микробной обсемененности (консервации) в качестве тест-микроорганизма используют культуру E.coli (шт.1257). Фекально-мочевую взвесь готовят из расчета: 1 часть фекалий и 4 части мочи. В пробирки разливают по 4,5 мл фекально-мочевой взвеси и добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл взвеси тест-культуры, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Неразведенное ДС или его растворы добавляют к фекально-мочевой взвеси в различных соотношениях. По истечении времени воздействия из каждой пробы отбирают по 0,5 мл жидкости и переносят в пробирки с 4,5 мл казеинового бульона. Это обеспечивает нейтрализацию ДС. После ряда серийных разведений из каждой пробирки производят высев на чашки Петри с питательным агаром (мясо-пептонный, Эндо). Результаты эксперимента учитывают через 48 часов инкубации при плюс 37°С. В контрольных пробах вместо препарата применяют стерильную питьевую воду.

Эффективным считают ДС, обеспечивающее снижение микробной обсемененности фекально-мочевой взвеси не менее чем на 99,9% и не более чем через 120 мин.

Критерий эффективности обеззараживания выделений – 100% гибель тест-микроорганизмов.

Время обеззараживания выделений, контаминированных тест-микроорганизмами S.aureus, E.coli и др. – не более 6 часов.

1.1.3.8 Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воздуха

Целью исследования является определение эффективности химических ДС и разработка режимов их применения для обеззараживания воздуха в помещениях.

Химические ДС применяют для обеззараживания воздуха в помещениях в виде аэрозолей или паров растворов ДС, а также газов.

При исследовании эффективности обеззараживания воздуха химическими ДС в качестве тест-микроорганизмов используют S.aureus.

Исследования проводят в испытательных камерах объемом 1-2 $м^3$. Предварительно внутреннюю поверхность камеры моют раствором моющего средства, остатки которого затем смывают водопроводной водой и включают бактерицидный УФ-облучатель. В центре камеры располагают продезинфицированный вентилятор, производительностью 15-25 $м^3$/ч, назначение которого - предотвращение быстрого оседания микроорганизмов.

Помещение, в котором находится испытательная камера, должно быть оборудовано УФ-облучателем рециркуляторного типа, который функционирует в течение всего эксперимента. Перед началом работы исследователь надевает халат, резиновые перчатки и маску.

При определении эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воздуха, используют 2 метода: седиментационный и аспирационный.

Седиментационный метод.

Для проведения исследований седиментационным методом камера должна иметь окошко с дверцей размером 20х20 см для внесения в камеру чашек Петри.

Растопленный агар с добавленным нейтрализатором разливают по чашкам Петри (питательную среду не подсушивают).

До начала распыления суспензии тест-микроорганизма отбирают пробу на контроль обсемененности воздуха в камере, для чего открытую чашку Петри с питательной средой помещают на 30 мин. в камеру.

Затем в камере распыляют суспензию тест-микроорганизма в количестве, достаточном для создания в воздухе камеры концентрации микроорганизмов $2{,}1 \times 10^4$ КОЕ/$м^3$.

Аэрозоль создают с помощью распыливающей аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80% частиц с дисперсностью 10+5мкм, и включают вентилятор. Для контроля степени контаминации воздуха открытую чашку Петри с питательной средой помещают в камеру на 10 мин.

Затем в камере распыляют раствор исследуемого средства и через определенные промежутки времени проверяют обсемененность воздуха.

Аспирационный метод.

Этот метод основан на аспирировании воздуха через жидкость. При использовании аспирационного метода для оценки эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воздуха, необходимо следующее оборудование:

– воздуходувка с производительностью 15-25 л/мин.;

– стерильные склянки Дрекселя с 50 мл стерильной водопроводной воды из расчета 2 шт. на 1 пробу. Предварительно в стерильную воду вносят соответствующий нейтрализатор;

– трубка диаметром 8-10 мм, длиной 50-60 см, которая вводится в камеру для забора проб воздуха в центре камеры;

– стерильные резиновые шланги, соединяющие склянки Дрекселя (последовательно одну за другой) и далее с воздуходувкой.

Подготовка камеры к эксперименту осуществляется, как указано выше. Для исследования отбирается 50 л воздуха (объем пробы).

Очередность отбора проб следующая:

– контроль обсемененности воздуха до начала распыления суспензии тест-микроорганизмов;

– контроль обсемененности воздуха после распыления суспензии тест-микроорганизма;

– контроль эффективности обеззараживания - отбор проб через каждые 5-10 мин в зависимости от предполагаемой эффективности ДС.

После отбора проб жидкость из 2-х склянок Дрекселя смешивают и по 1-2 мл вносят в стерильную чашку Петри; затем заливают растопленным агаром. Посевы помещают в термостат. После инкубации подсчитывают количество выросших колоний и рассчитывают обсемененность 1 м^3 воздуха.

Например:

$$X = \frac{10 \cdot 0{,}05 \cdot 1000}{50} = 10$$

X – КОЕ/м^3

10 – количество колоний, выросших на чашке Петри;

0,05 – объем стерильной питьевой воды, л;

1000 = 1 м3 воздуха камеры, л;

50 – объем пробы воздуха, л.

Критерий эффективности обеззараживания воздуха в соответствии с категорией помещения, % (не менее): I – 99,9; II – 99,0; III – 95,0; IV – 90,0; V – 85,0

1.1.3.9. Исследование эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания питьевой воды и воды плавательных бассейнов

Методы распространяются на испытания химических ДС для обеззараживания индивидуальных и групповых запасов питьевой воды и воды плавательных бассейнов. Обеззараженная питьевая вода должна соответствовать требованиям национальных нормативных документов.

СанПиН 2.1.4.1175-02 «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников», ГОСТ 27283-87, а вода плавательных бассейнов - требованиям СанПиН 2.1.2.1188-03 «Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества».

ДС для обеззараживания питьевой воды должны обеспечивать гибель в воде тест-микроорганизмов при их исходной концентрации:

бактерий, не образующих споры, – 10^5-10^6 КОЕ/л;

вирусов – 10^5-10^6 УЕ/л;

бактерий в споровой форме – не менее 10^5-10^6 спор/л (при необходимости – в зависимости от назначения средства, см. п. 5.8.).

ДС для обеззараживания воды плавательных бассейнов должны обеспечивать гибель в воде тест-микроорганизмов при исходной концентрации:

при разработке режимов для постоянного обеззараживания воды в присутствии посетителей:

бактерий, не образующих споры, – 10^2-10^3 КОЕ/л;

вирусов – 10^2-10^3 УЕ/л.

при разработке режимов для обеззараживания воды во время продолжительного перерыва в работе бассейна (более 2 ч):

бактерий, не образующих споры, – 10^5-10^6 КОЕ/л;

вирусов – 10^5-10^6 УЕ/л.

Тест-микроорганизмы.

В качестве тест-микроорганизмов при изучении средств обеззараживания питьевой воды используют культуры E.coli (штамм 1257), РНК-содержащего колифага MS2.

В качестве тест-микроорганизмов при изучении средств обеззараживания воды плавательных бассейнов используют культуры E.coli (штамм 1257), S.aureus (штамм 906) и РНК-содержащего колифага MS2.

Питательные среды, методы культивирования и приготовления для экспериментов тест-культур бактерий, не образующих споры, приведены в п.п. 1.1., 1.3., 1.7.

Колифаг MS2 (штамм ВКПМ-3254) и штамм культуры клеток-хозяина E.coli K12 F+ StrR получают во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ГНИИ «Генетика», адрес: 113545, г. Москва, 1-ый Дорожный проезд, д. 1.

Исследования проводят в соответствии с Методическими указаниями «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» МУК 4.2.1018-01, Минздрав России, М., 2001.

Питательные среды и реактивы для колифага MS2 и E.coli K12 F^+ Str^R:

Сухой питательный бульон

Агар питательный сухой	ТУ 42-14-33-75
Стрептомицин стерильный	
Хлороформ технический	ГОСТ 20015-76

Приготовление питательных сред для колифага MS2 и E.coli K12 F+ StrR.

Питательный бульон готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке; питательный бульон (десятикратный) для колифагов – путем увеличения в 10 раз навески сухого препарата, указанной на этикетке; питательный агар – из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке; питательный агар двойной концентрации для определения колифагов прямым методом – путем увеличения навески сухого препарата в 2 раза от прописи.

Питательный агар запрещается выдерживать в расплавленном состоянии более 8 ч. Оставшийся неиспользованным агар повторному расплавлению не подлежит.

Полужидкий питательный агар готовят следующим образом: сухой питательный бульон (15 г) и агар микробиологический (3 г) растворить при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды. Довести pH до 7,0 – 7,2, разлить в пробирки и стерилизовать автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 мин.

Питательный агар со стрептомицином готовят из расчета содержания 100 мкг стрептомицина на 1 мл питательного агара, приготовленного по стандартной прописи. Стерильно на стерильной дистиллированной воде готовят раствор стрептомицина в концентрации 10 мг на 1 мл. В готовый питательный агар, отмеренный по объему и остуженный до температуры 45-49°С, вносят приготовленный

стерильный раствор стрептомицина из расчета 0,1 мл на 10 мл питательного агара. Разливают в пробирки для приготовления скошенного агара. Повторное расплавление питательной среды со стрептомицином запрещается.

Ведение культур колифага MS2 и культуры клеток-хозяина E. coli K12 F+ StrR. Процесс ведения культур колифага MS2 и E. coli K12 F+ StrR включает:

восстановление лиофилизированных культур колифага MS2 и E.coli K12 F+ StrR;

создание запасов культур колифага MS2 и E.coli K12 F+ StrR для целевого использования.

Для восстановления лиофилизированной культуры E.coli K12 F+ StrR оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки. Влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом и хорошо отжатой, и обламывают пинцетом. После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1-2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезраствор. В ампулу вносят 0,5 мл питательного бульона для регидратации. Содержимое ампулы перемешивают, переносят стерильной пастеровской пипеткой или шприцем в пробирку с питательным бульоном и инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18-24 ч.

После инкубации из питательного бульона делают высев петлей на скошенный питательный агар по ТУ 42-14-33-75, содержащий

стрептомицин. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18-24 ч.

Культуру на скошенном питательном агаре проверяют на способность лизироваться специфическим колифагом MS2, а также на загрязненность фагом. При удовлетворительных результатах указанных проверок культура считается пригодной для проведения исследований с колифагом MS2.

Для создания запасов рабочей культуры E.coli K12 F+ StrR культуру со скошенного питательного агара со стрептомицином засевают уколом в столбик с полужидким питательным агаром. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18-24 ч. При наличии роста пробирки закрывают резиновыми (силиконовыми) пробками и закладывают на хранение при температуре 4-8 °С. Восполнение запасов рабочей культуры проводят через 3 месяца.

На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь культуры E.coli K12 F+ StrR, приготовленную следующим образом. Культуру, выращенную в пробирке со скошенным питательным агаром со стрептомицином, смывают с косяка 5 мл стерильного физиологического раствора и по стандарту мутности готовят взвесь в концентрации 109 бактериальных клеток в 1 мл. Допускается использование 4-часовой бульонной культуры E.coli, полученной путем подращивания в термостате при температуре 37±1°С. Концентрация 109 бактериальных клеток E.coli содержится в 2 мл.

Для восстановления лиофилизированной культуры колифага MS2 оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки. Влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной

70% этиловым спиртом и хорошо отжатой, и обламывают пинцетом. После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1-2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезраствор. В ампулу вносят 0,5 мл питательного бульона для регидратации.

Для создания запасов культуры колифага MS2 используют рабочую культуру клеток-хозяина E.coli K12 F+ StrR, хранящуюся на полужидком агаре, которую засевают в пробирку с 10 мл питательного бульона. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18-24 ч.

После инкубации 0,1 мл полученной бульонной культуры E.coli K12 F+ StrR повторно засевают в 3-4 пробирки с 10 мл питательного бульона и помещают в термостат при температуре 37±1°С. Через 2 ч инкубации в каждую пробирку вносят регидрированную культуру фага MS2, инкубацию продолжают до 18-24 ч. После инкубации в пробирку добавляют по 1 мл хлороформа, герметично укупоривают, интенсивно встряхивают и помещают в холодильник.

Титр полученной культуры колифага MS2 определяют следующим образом. Готовят 7-8 десятикратных разведений культуры колифага MS2. По 1 мл из каждого разведения вносят в чашки Петри и заливают смесью питательного агара и взвеси культуры E.coli K12 F+ StrR из расчета 1 мл взвеси на 100 мл агара. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С. Пробирки с разведениями закупоривают резиновыми (силиконовыми) пробками и хранят до получения результатов при температуре 4±2°С для получения рабочих суспензий фага.

Через 18-24 ч инкубации подсчитывают число бляшек на чашках. Учету подлежат чашки, на которых отмечается рост 30-100 негативных

колоний фага. Для использования допускается культура с титром не менее 107.

При получении титра менее 107 фаг можно размножить. Для этого необходимо повторить описанную процедуру.

Методика постановки экспериментов.

В качестве исходной воды используют водопроводную или природную воду (колодезную, речную), показатели качества которой соответствуют назначению испытываемого дезинфицирующего средства. Водопроводную воду перед использованием дехлорируют нагреванием при температуре 50-60°С с последующим выдерживанием в течение одних суток. В образцах природной воды определяют общее микробное число и общие колиформные бактерии.

Исходную воду наливают в емкости с нижним тубусом объемом 5-10 л и контаминируют культурами тест-микроорганизмов.

После внесения расчетной дозы микроорганизмов воду тщательно перемешивают и отбирают пробы для определения концентрации исходного заражения воды микроорганизмами.

Концентрацию исходного заражения воды бактериями определяют следующим образом. Из емкости отбирают 1-3 пробы воды (в зависимости от объема емкости) по 3-5 мл. Из каждой пробы делают по 3-4 последовательных десятикратных разведения в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде, в которых затем определяют число бактерий в 1 мл пробы воды методом мембранной фильтрации.

Сущность метода заключается в концентрировании микроорганизмов из определенного объема анализируемой воды путем фильтрования через мембранные фильтры, выращивании посевов при температуре 37±1°С на плотной питательной среде и в подсчете

количества бактерий в единице объема воды. Используют мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества. Мембранные фильтры готовят к анализу в соответствии с указаниями производителя.

Фильтрование воды проводят с помощью прибора для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм с устройством для создания разрежения 0,5-1,0 атм. Воронку и столик прибора перед анализом воды стерилизуют в паровом или воздушном стерилизаторе. На нижнюю часть прибора (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр; прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой); закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора, наливают при соблюдении правил стерильности необходимый объем воды и создают вакуум в приемном сосуде. Фильтруют сначала меньшие, затем большие объемы воды через один фильтровальный прибор, сменяя каждый раз фильтры. После окончания фильтрования стакан (воронку) снимают, фильтр осторожно приподнимают за край фламбированным пинцетом при сохранении вакуума для удаления излишней влаги на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая, на плотную питательную среду в чашку Петри так, чтобы между средой и фильтром не было пузырьков воздуха.

При определении числа бактерий E.coli используют питательный агар Эндо, S.aureus – казеиновый или мясо-пептонный агар. Под каждым фильтром на обратной стороне дна чашки Петри делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева и номера пробы. Посевы с E.coli, S.aureus инкубируют при температуре

37±1°С в течение 24-48 ч. По окончании инкубации учитывают количество выросших на фильтрах колоний и определяют концентрацию тест-микроорганизмов в 1 л воды по формуле:

$$C = \frac{K}{V} N \cdot 1000,$$

где С – количество тест-микроорганизмов, содержащихся в 1 л воды;

К – кратность разведения;

V – посеянный объем в мл;

N – среднее арифметическое числа колоний, выросших на мембранных фильтрах при высевах одинаковых разведений.

Результат анализа при определении числа бактерий выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 л воды.

Концентрацию исходного заражения воды колифагом MS2 определяют следующим образом. При исходной концентрации колифага на уровне 10^5-10^6 БОЕ/л из емкости отбирают пробу воды объемом 5-10 мл. Готовят 3-4 последовательных десятикратных разведения в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде. По 1 мл из каждого разведения вносят в чашки Петри и заливают смесью питательного агара и взвеси культуры E.coli К12 F+ StrR из расчета 1 мл взвеси на 100 мл агара. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С. Через 18-24 ч инкубации подсчитывают количество бляшек на чашках. Учету подлежат чашки, на которых отмечается рост 30-100 негативных колоний фага. Подсчитывают число негативных колоний на 2-3 чашках с наиболее характерным и четким ростом. По этим данным определяют среднее число колоний, которое умножают на величину наибольшего разведения.

При исходной концентрации колифага на уровне 10^2-10^3 БОЕ/л из емкости отбирают пробу воды объемом 150-200 мл. Готовят десятикратное разведение в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде. Колифаг определяют в 1 мл из десятикратного разведения, а также в 1, 10 и 100 мл исходной зараженной воды.

Посев 1 мл из десятикратного разведения, а также 1 мл исходной воды осуществляют как при исходном заражении воды на уровне 10^5-10^6 БОЕ/л.

Посев 10 мл исходной воды осуществляют следующим образом. 10 мл исходной воды вносят в питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45-49°С, добавляют смыв E.coli K12 F+ StrR из расчета 2 мл смыва (или 4 мл 4-часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара, перемешивают. Чашки с посевами оставляют при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром помещают дном вверх в термостат и инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18±2 ч.

Посев 100 мл исходной воды осуществляют следующим образом. В питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45-49°С, добавляют смыв E.coli K12 F+ StrR из расчета 2 мл смыва (или 4 мл 4-часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара, перемешивают. Исследуемые 100 мл воды разливают по 20 мл в большие пробирки, нагревают до плюс 35-44°С и немедленно (не более чем через 5 мин. по достижении требуемой температуры) разливают в 5 чашек Петри и сразу же вносят в каждую чашку по 20 мл смеси агара с культурой E.coli K12 F+ StrR, осторожно перемешивают.

Для контроля культуры E.coli K12 F+ StrR в одну чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды, предварительно

прогретой до 35-44°С, заливают 20 мл приготовленного агар с E.coli K12 F+ StrR и осторожно перемешивают.

Чашки с посевами оставляют при комнатной температуре до застывания. Затем чашки с застывшим агаром помещают дном вверх в термостат и инкубируют при температуре 37±1°С в течение 18±2 ч. Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5 чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

По результатам определения числа частиц колифага в 1, 10 и 100 мл исходной воды рассчитывают исходное заражение воды колифагом и выражают его в БОЕ/л.

Для обеззараживания воды ДС вносят в емкость с зараженной водой в необходимых концентрациях и тщательно перемешивают. Через заданные промежутки времени при соблюдении условий стерильности отбирают пробы воды объемом 1 л в стерильные флаконы с внесенным в них нейтрализатором, подобранным в соответствии с рецептурой дезинфицирующего средства, и определяют микробиологические показатели обеззараженной воды. Пробы воды должны быть исследованы не позднее чем через 1 ч после их отбора. При условии хранения проб в холодильнике при температуре 1-5°С допускается проводить анализ не позже чем через 6 ч после отбора проб.

Число бактерий культур S.aureus, E.coli в обеззараженной воде определяют методом мембранной фильтрации.

На начальных этапах обеззараживания воды анализируют не менее двух проб воды, отличающихся по объему в 10 раз и выбранных таким образом, чтобы на одном из фильтров выросло не более

300 колоний. На одну чашку можно поместить 3-4 фильтра с условием, чтобы фильтры не касались друг друга.

При анализе воды на конечных этапах обеззараживания исследуют объем не менее 1 л, профильтровывая это количество не менее чем через 3-4 фильтра.

Посевы инкубируют как указано в п. 5.2. Учитывают количество выросших колоний на фильтрах, результат анализа выражают числом бактерий в 1 л воды.

Идентификация общих и термотолерантных колиформных бактерий.

К общим колиформным бактериям (ОКБ) относятся грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре плюс 37±1°С в течение 24-48 ч.

Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 44±0,5°С в течение 24 ч.

При отсутствии роста на фильтрах или при наличии только пленчатых, губчатых, плесневых, прозрачных и расплывчатых колоний через 18-24 ч. дают отрицательный ответ.

При росте на фильтрах колоний, характерных для кишечных палочек (темно-красных с металлическим блеском и без него, красных, розовых слизистых, розовых с темным центром, бесцветных, с отпечатком на обратной стороне фильтра), выполняют оксидазный тест, для чего мембранный фильтр колониями вверх переносят на кружок

фильтровальной бумаги, смоченный реактивом для определения оксидазной активности.

Учитывая бактерицидность реактивов для определения оксидазной активности, мембранный фильтр сразу после проявления реакции следует перенести обратно на среду Эндо.

Наличие активной оксидазы (изменение цвета колоний на сине-фиолетовый) у всех колоний, за исключением нехарактерных для ОКБ и ТКБ, позволяет дать отрицательный ответ и закончить анализ через 18-24 ч.

Если выросли колонии, не обладающие оксидазной активностью, то из нескольких колоний каждого типа готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Отсутствие в мазках грамотрицательных, не образующих спор палочек, позволяет дать отрицательный ответ и закончить анализ через 18-24 ч.

Красные и темно-красные колонии с металлическим блеском и без него (лактозоположительные), образованные грамотрицательными палочками, не обладающими оксидазной активностью, подсчитывают и относят к общим и термотолерантным колиформным бактериям.

Результат анализа выражают числом бактерий в 1 л воды.

Определение числа частиц колифага MS2 в обработанной воде в пробах объемом 1 л проводят методом обогащения (Корнилова Н.М., 1988 г.). Для этого пробу обеззараженной воды объемом 1 л разливают в стерильные флаконы по 500, 200, 100, 50 и 20 мл, добавляют 10% десятикратного питательного бульона для колифагов и суспензию суточной культуры E.coli K12 F+ StrR. После инкубирования при температуре 37±1°С в течение 18-24 ч жидкость разливают в пробирки, встряхивают с хлороформом для устранения бактериальной флоры и

определяют число частиц колифага MS2. Для этого по 1 мл из каждой пробирки вносят в чашки Петри и заливают смесью питательно агара и взвеси культуры E.coli K12 F+ StrR из расчета 1 мл взвеси на 100 мл агара. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С. Через 18-24 ч инкубации подсчитывают число бляшек на чашках. В зависимости от того, в каком из объемов выявлен рост колифага, вычисляют наиболее вероятное число фаговых частиц в 1 л воды, пользуясь табл. 1.3.

Таблица 1.3.

Расчет числа фаговых частиц при определении титра фага в 1 л воды методом обогащения

Присутствие фага после инкубации в пробах воды объемом (мл)					Число БОЕ в 1 л воды
500	200	100	50	20	
—	—	—	—	—	0
+	—	—	—	—	2
+	+	—	—	—	5
+	+	+	—	—	10
+	+	+	+	—	20
+	+	+	+	+	≥ 50

Обработка и оценка результатов микробиологических исследований. Статистическая обработка результатов микробиологических анализов по оценке эффективности способов и средств обеззараживания воды имеет целью исключить случайные ошибки, оценить отклонение результатов анализов от действительной величины и дать искомые результаты с заданной вероятностью.

Случайные ошибки бактериологических анализов, как правило, распределены по нормальному закону, поэтому в процессе статистической обработки результатов экспериментальных исследований рекомендуется использовать при определении концентрации заражения исходной воды и на промежуточных этапах

обработки – среднюю арифметическую (x), а при оценке эффективности обеззараживания воды на завершающем этапе – медианное значение (Me).

Количество проб n, необходимых для действительной оценки результатов микробиологических исследований, определяют по формуле:

$$n = \left(\frac{\sigma\, t_p}{I_p}\right)^2,$$

где σ – квадратичное отклонение;

Ip – максимальное допустимое отклонение от средней, оцениваемое с вероятностью p=0,99;

tp – коэффициент, зависящий от числа опытов (не менее 10), по которым определялась величина σ.

Если σ определяется по данным 16 опытов, то $t_{0,99} = 2,7$.

Число проб для оценки содержания микроорганизмов в обеззараженной воде должно быть не менее 16.

Оценку результатов бактериологических анализов проводят для заданной вероятности 0,99, соответственно для того же значения определяют доверительный интервал средней арифметической и медианы.

Доверительный интервал средней арифметической определяют по данным величины квадратичного отклонения σ и средней ошибки σ x .

Величину квадратичного отклонения вычисляют по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - x)^2}{n - 1}},$$

где $\sum (x - x)^2$ – сумма квадратов отклонений результатов отдельных измерений от средней арифметической, а n – число отдельных измерений.

Среднюю ошибку вычисляют по формуле:

$$\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Вероятности 0,99 отвечает доверительный интервал I, вычисляемый по формуле

$$I_{0,99} = \pm 2,7\ \sigma_x$$

Доверительный интервал медианы (медианного значения) для требуемого уровня вероятности 0,99 определяют в зависимости от числа проведенных опытов по таблице 1.4., в которой указаны номера опытов, результаты которых учитывают в качестве граничных значений доверительного результата медианы.

Таблица 1.4.

Граничные значения доверительного интервала медианы

Число опытов	Нижняя граница	Верхняя граница	Число опытов	Нижняя граница	Верхняя граница
7	-	-	27	7	21
8	1	8	28	7	22
9	1	9	29	8	22
10	1	10	30	8	23
11	1	11	31	8	24
12	2	11	32	9	24
13	2	12	33	9	25
14	2	13	34	10	25
15	3	13	35	10	26
16	3	14	36	10	27
17	3	15	37	11	27
18	4	15	38	11	28
19	4	16	39	12	28
20	4	17	40	12	29
21	5	17	41	12	30
22	5	18	42	13	30
23	5	19	43	13	31
24	6	19	44	14	31
25	6	20	45	14	32
26	7	20	46	14	33
			47	15	33
			48	15	34
			49	16	34
			50	16	35

Для пользования табл. 5.4. необходимо, чтобы результаты опытов были расположены и пронумерованы в порядке возрастания их величин.

Показателем эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воды, является 100% снижение обсемененности воды, контаминированной тест-микроорганизмами, то есть отсутствие тест-микроорганизмов в 1 л обеззараженной воды.

1.2 Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств

1.2.1 Общие положения

Для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС в качестве тест-микроорганизмов используются: Mycobacterium terrae (DSM 43227), Mycobacterium B5, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacteriит smegmatis cip 7326, Mycobacteriит avium ATCC 15769 (ДСМ 44157).

Исследования туберкулоцидной активности субстанций, ДС и эффективности режимов применения ДС включают:

выбор и подготовку культур тест-микроорганизмов для изучения туберкулоцидной активности ДС и субстанций;

обеспечение стандартности условий проведения исследований туберкулоцидной активности ДС и субстанций;

методы исследований и оценки результатов туберкулоцидной активности ДС и субстанций in vitro (суспензионный метод, метод батистовых (бязевых) тест-объектов);

методы исследований туберкулоцидной эффективности ДС с использованием искусственно контаминированных тест-микобактериями различных тест – объектов с целью разработки

режимов обеззараживания тех или иных объектов в отношении возбудителя туберкулеза (поверхностей в помещениях, транспорта, санитарно-технического оборудования, мебели, посуды, белья, одежды, предметов ухода за больными, медицинских приборов, инструментов и других изделий медицинского назначения и т.д.);

методы исследований туберкулоцидной эффективности ДС в практических условиях.

1.2.1.1 Тест-микроорганизмы для изучения туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций.

Требования к тест-микроорганизмам

Исследование и оценку туберкулоцидной и микобактерицидной (в отношении непатогенных микобактерий) активности ДС, предлагаемых для применения на территории России, проводят, используя в качестве тест-микроорганизмов:

агаровую культуру Mycobacterium B5 для оценки эффективности и разработки туберкулоцидных режимов камерного обеззараживания различных объектов;

агаровую культуру Mycobacterium terrae (DSM 43227) для оценки активности ДС и разработки режимов их применения при обеззараживании объектов в отношении возбудителя туберкулеза и микобактериозов;

агаровую культуру Mycobacterium tuberculosis для подтверждения эффективности разработанных режимов применения ДС в отношении возбудителей туберкулеза и микобактериозов в практических условиях.

Тест-микобактерии должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические, тинкториальные и ферментативные свойства, присущие данному штамму (см. Приложение 1), и обладать

стандартной устойчивостью к эталонным ДС и температуре. Культура Mycobacterium B5 должна быть устойчива к температуре 60°С в течение 60 мин. Показатели устойчивости, которым должна соответствовать культура Mycobacterium terrae приведены в таблице 1.5.

Таблица 1.5

Устойчивость Mycobacterium terrae к эталонным ДС

ДС	Концентрация раствора, %	Время гибели Mycobacterium terrae, мин.
Хлорамин Б (28,0% по активному хлору)	5,0*	120
Глутаровый альдегид	0,5	60
Перекись водорода	4,0	60

Примечание: * указана концентрация по препарату

Получение и хранение исходной рабочей культуры тест- микобактерий

Для выращивания культур тест-микобактерий используют плотные питательные среды. Перечень и методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микобактерий, предназначенных для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций, приведены в Приложении 2. В отличие от питательных сред, рекомендуемых в стандарте NEN-EN 14476, использование приведенных в приложении питательных сред позволяет получать результат оценки туберкулоцидной активности ДС не на 21 сутки, а на 10-14 сутки.

Для получения культуры штамма тест-микобактерий ампулу с лиофилизированной музейной культурой этого штамма вскрывают и стерильной пипеткой в ампулу вливают 1,0 мл стерильного физиологического раствора и оставляют в течение 30 мин при комнатной температуре для получения суспензии. Суспензию, приготовленную из музейной тест-культуры, рассевают по 0,1 мл в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или

«Новая» (всего 10 пробирок). Посевы инкубируют в термостате при 37±1°С в течение 14-21 суток.

Полученную биомассу снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с поверхности питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» со всех пробирок и помещают в пробирку с 10 мл бульона Миддлбрука 7H9 с 10% ADC ростовой добавкой, смесь гомогенизируют, доводят объем полученной суспензии до 100 мл бульоном Миддлбрука 7H9 и по 0,5 мл суспензии вносят в криопробирки.

Суспензию замораживают при минус 70°С или хранят в бытовом холодильнике при минус 20ºС. Срок хранения культуры в таких условиях – не более 5 лет.

Полученная и хранящаяся таким образом культура тест-микобактерий используется для получения агаровой культуры тест-микобактерий (первый пассаж) и приготовления из нее рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой для проведения испытаний ДС.

1.2.1.2 Методика приготовления суспензии тест-микроорганизмов. Определение биологической концентрации тест-микроорганизмов в суспензии

Для получения первого пассажа культуры тест-штамма микобактерий, используемой при оценке ДС, необходимое для исследования количество хранящихся при температуре минус 70°С или минус 20ºС криопробирок (2 штуки на 1 исследование) с данным штаммом микобактерий размораживают при комнатной температуре, переносят по 0,1 мл содержимого в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» и инкубируют

в термостате при 37±1°С в течение 14-21 суток. Выросшую на плотной питательной среде в пробирках культуру используют для приготовления рабочей суспензии тест-микобактерий данного штамма.

Культуры тест-микроорганизмов подвергают контролю их качества. В частности, непосредственно перед использованием культур для исследовательских целей необходимо убедиться в том, что тест-штаммы, выросшие на питательной среде, не загрязнены посторонней микрофлорой. Для оценки роста культур микобактерий тест-штаммов визуально просматривают каждую пробирку и учитывают характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Проводят микроскопию мазка выросших культур методом окраски по Циль-Нильсену (M.terrae представляют собой короткие прямые палочки малиново-красного цвета, располагающиеся в мазке параллельно друг другу, наподобие частокола. Размер клеток микобактерий 0,2-0,6х1-10 мкм).

Рабочую суспензию культуры тест-микобактерий готовят из тест-штамма первого и/или второго пассажей, выросших на плотной питательной среде. Дальнейшее субкультивирование недопустимо!

Для приготовления рабочей суспензии культуру микобактерий снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с плотной питательной среды и помещают в толстостенную стеклянную пробирку. Микробную биомассу тщательно гомогенизируют, постепенно добавляя по каплям стерильный физиологический раствор. Густую исходную бактериальную суспензию оставляют на 15 мин. для осаждения негомогенизированных конгломератов и частиц. Полученную надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой, переносят в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности (стандарт мутности

производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, стандарт мутности по МакФарланду) и стандартизуют по оптическому стандарту мутности, соответствующему $1 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл), добавляя стерильную дистиллированную воду.

Суспензия, содержащая такое количество живых микробов, при контаминации ею бязевых (батистовых) тест-объектов, тест-поверхностей и др. обеспечивает требуемые (порядка $1 \cdot 10^5$-$1 \cdot 10^6$ КОЕ/см^2) уровни их обсеменения живыми клетками тест-микроба.

Однако в связи с тем, что микобактерии могут отмирать в результате хранения или по иным причинам, а мертвые микроорганизмы, присутствующие в суспензии, будут, как и живые, давать помутнение суспензии, необходимо осуществлять бактериологический контроль фактического количества живых клеток в приготовленной суспензии, чтобы, при необходимости, внести коррективы и обеспечить требуемые уровни контаминации тест-объектов жизнеспособными микобактериями.

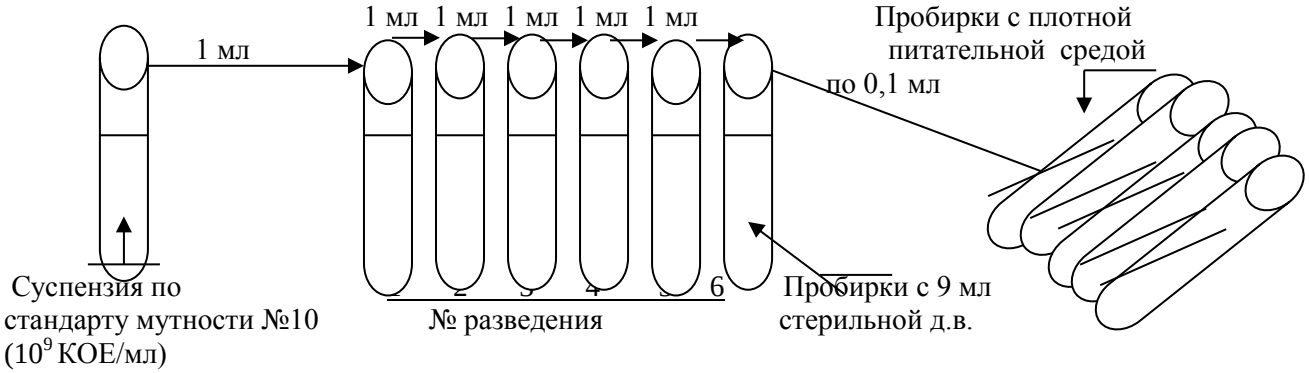
Определение биологической концентрации тест-микроба в рабочей суспензии

Из суспензии, приготовленной по оптическому стандарту мутности №10 (10^9 КОЕ/мл), делают, как показано на схеме 1.2., разведения с 10-кратным шагом до 10^3 микробных клеток в 1 мл (посев 0,1 мл суспензии из этого разведения на плотную питательную среду позволяет произвести достаточно точный подсчет выросших на среде колоний микобактерий, количество которых будет находиться в пределах 100 единиц).

Схема 1.2.

Проведение эксперимента по контролю количества живых микобактерий в рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой для оценки туберкулоцидной активности ДС

Разведения готовят следующим образом:



Первое разведение соответствует 10^8 КОЕ/мл, а шестое – 10^3 КОЕ/мл. Из этого разведения производят посев по 0,1 мл на 5 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», инкубируют в термостате при 37°С в течение 14-21 суток. Подсчитывают количество выросших колоний на среде в пробирке, рассчитывают среднее значение из 5 и делают пересчет количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии, учитывая коэффициент разведения. Количество жизнеспособных клеток в рабочей суспензии должно быть 10^9 КОЕ/мл.

Посев суспензии в пробирки со скошенной плотной питательной средой позволяет существенно экономить расход среды и избежать пересыхания и растрескивания среды, наблюдаемого при использовании чашек Петри с плотной питательной средой.

Расчет количества жизнеспособных бактериальных клеток в приготовленной исходной суспензии осуществляют по следующей формуле:

$X = A \times 10^7$, где

X – количество жизнеспособных бактериальных клеток в 1 мл приготовленной суспензии;

A – среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 чашках Петри;

107 – коэффициент пересчета, учитывающий степень разведения суспензии (106) и объем, использованный для посева (0,1 мл).

Например:

получен рост микобактерий в первой пробе – 70 КОЕ, во второй – 130 КОЕ, в третьей – 99 КОЕ, в четвертой – 115 КОЕ, в пятой – 97 КОЕ. Тогда среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках, будет равно:

A=(70+130+99+115+97):5 = 102

X = 102 x 107 = 109 микробных тел в 1 мл, что соответствует оптическому стандарту мутности №10 (1 млрд. микробных тел (109) в 1 мл.

1.2.1.3. Определение устойчивости тест-микроорганизмов к эталонным ДС

Определение устойчивости тест-микобактерий к воздействию температуры.

В стерильный стеклянный стакан объемом 100 мл наливают 50 мл стерильной дистиллированной воды и помещают в водяную баню. Рядом с ним в водяной бане помещают стеклянный стакан объемом 100 мл с 50 мл дистиллированной воды и с помещенным в нее термометром, позволяющим измерять температуру до 100°С. Включают водяную баню, доводят температуру воды в стакане до 60°С и поддерживают эту температуру на протяжении всего эксперимента.

В стерильные пробирки разливают по 5 мл стерильной питьевой воды комнатной температуры (количество пробирок соответствует количеству отбираемых в опыте проб). Исходя из количества проб, готовят пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая». Готовят и контаминируют тест-микроорганизмами батистовые тест-объекты (п. 1.1.2.2.). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные микобактериями тест-объекты, то их заранее извлекают из холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18-20°С).

Отсчитывают в чашке Петри необходимое для опыта количество батистовых тест-объектов (по 2 на каждую экспозицию), контаминированных тест-микобактериями, захватывают тест-объекты стерильным пинцетом все сразу и опускают их в стакан со стерильной питьевой водой, нагретой в водяной бане до 60°С. Легким покачиванием емкости добиваются полного смачивания тест-объектов. В момент смачивания всех тест-объектов отмечают время.

Через каждые 15 мин. стерильным пинцетом извлекают по 2 тест-объекта и опускают их в пробирку с 5 мл стерильной питьевой воды при температуре 20±2°С для нейтрализации действия температурного фактора. Через 5 минут каждый тест-объект помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Для контроля два контаминированных тест-микобактерией тест-объекта погружают в стерильную питьевую воду при температуре 20±2°С на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре 37±1°С; наличие роста тест-культур проверяют через 10-14 суток.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Тест-микобактерии должны быть устойчивы к нагреванию при 60°С не менее 1 часа.

Определение устойчивости тест-микобактерий к эталонным ДС

Для определения устойчивости микобактерий в качестве эталонных ДС используют монохлорамин Б, глутаровый альдегид и перекись водорода медицинскую.

Методом йодометрического титрования определяют процент активного хлора в монохлорамине Б. В опытах используют препарат, содержащий 26,0-28,0% активного хлора, растворяя который в дистиллированной воде в соотношении 1:20 готовят рабочий раствор (5,0% по препарату).

Глутаровый альдегид (зарегистрированный в России как субстанция) разводят дистиллированной водой до концентрации рабочего раствора 0,5% (по глутаровому альдегиду).

Массовую долю перекиси водорода медицинской определяют методом перманганатометрического титрования в соответствии с ГОСТ 177-88. Готовят 4,0% раствор (по перекиси водорода).

Предварительно готовят и разливают в пробирки по 5 мл стерильный раствор нейтрализатора (п.1.2.1.4.); стерильную питьевую воду; пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая». Готовят и контаминируют тест-микобактериями батистовые тест-объекты (см. п. 1.2.2.2.). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные тест-микробом тест-объекты, то их

заранее извлекают из холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18-20°С).

Перед постановкой опыта контролируют содержание ДВ в рабочем растворе ДС.

При проведении экспериментов в стеклянную емкость объемом 50-100 мл пипеткой наливают требуемый объем раствора эталонного ДС, из расчета 0,5 мл на каждый тест-объект и помещают в водяную баню с температурой 20°С на весь период опыта. Отсчитывают в чашке Петри необходимое для опыта количество бязевых (батистовых) тест-объектов (по 2 на каждую экспозицию), контаминированных тест-микобактериями, захватывают стерильным пинцетом тест-объекты все сразу и опускают их в емкость с раствором ДС; легким покачиванием емкости добиваются полного смачивания тест-объектов. В момент смачивания всех тест-объектов отмечают время.

Через каждые 30 мин. стерильным пинцетом извлекают по 2 тест-объекта из раствора ДС и опускают их в пробирку с 5 мл 1,0% стерильного раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточного действия ДС. Пробирку с нейтрализатором и тестами не подвергают встряхиванию. Через 5-10 мин. тест-объекты переносят в пробирку с 5 мл стерильной питьевой воды. Еще через 10-15 мин. каждый тест-объект помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Для контроля два контаминированных тест-микобактериями тест-объекта погружают в стерильную питьевую воду (вместо раствора ДС) на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их переносят в раствор нейтрализатора (тиосульфат натрия) и помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре 37°С; наличие роста тест-культур проверяют через 14-21 сутки.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Тест-микобактерии должны быть устойчивы к 5,0% раствору монохлорамина не менее 2 часов; к 0,5% раствору глутарового альдегида – не менее 60 мин.; к 4,0% раствору перекиси водорода – не менее 60 мин.

В процессе испытаний контролируют температуру раствора ДС в опыте, исходный и остаточный уровень контаминации тест-микобактериями тест-объекта (КОЕ/см^2), время выдержки тест-объектов в испытуемом дезинфицирующем растворе.

1.2.1.4 Обеспечение стандартности условий проведения исследований активности ДС и их субстанций

Для обеспечения стандартности условий постановки экспериментов необходимо провести химико-аналитический контроль исследуемых ДС и их субстанций. До проведения исследования туберкулоцидной активности ДС и их субстанций необходимо ознакомиться с рецептурой средства и техническими условиями на отечественные или спецификацией на зарубежные средства, провести химико-аналитические исследования по определению концентрации действующих веществ в средствах и определить соответствие рецептуры и других показателей, регламентированным вышеуказанными документами. При этом используют химико-аналитические методы контроля и применяют условия хранения средства и меры безопасности при работе с ним, предложенные производителем средства.

Так как для дезинфекции при туберкулезе применяют средства, обладающие действием, убивающим микобактерии, а не задерживающие их рост, при определении туберкулоцидной активности и эффективности ДС необходимо разграничить туберкулоцидное действие препарата от туберкулостатического. Для этого применяют нейтрализторы, исключающие остаточное бактерицидное действие.

Для нейтрализации антимикробного действия дезинфицирующих средств из различных химических групп применяют следующие нейтрализаторы:

для галоидактивных (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 (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.), производные гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.) – 0,1-1,0% растворы лаурилсульфата натрия (сульфонол), растворы лаурилсульфата натрия с 10% обезжиренного молока или универсальный нейтрализатор (см. ниже);

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

для кислот – щелочи в эквивалентном количестве;

для щелочей – кислоты в эквивалентном количестве;

для спиртов – разведение в воде до не действующей концентрации;

для композиционных средств – универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3-3%), гистидин (0,1%), цистеин

(0,1%). Если в состав композиции входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия. Универсальным нейтрализатором является также нейтрализующий бульон по Ди-Ингли (фирма-производитель «HIMEDIA»). В его состав входят такие ингредиенты, как гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, глюкоза, натрия тиосульфат, натрия тиогликолят, натрия бисульфит, лецитин, Твин-80 и др.

Растворы нейтрализаторов стерилизуют автоклавированием при 1,1 атм. (121°С) в течение 15 мин.

Температура растворов нейтрализаторов должна быть 20°С, независимо от температуры окружающей среды.

Готовые растворы должны использоваться в день приготовления. Допускается хранение готовых растворов при температуре 4°С в течение 48 часов.

Контроль полноты нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС.

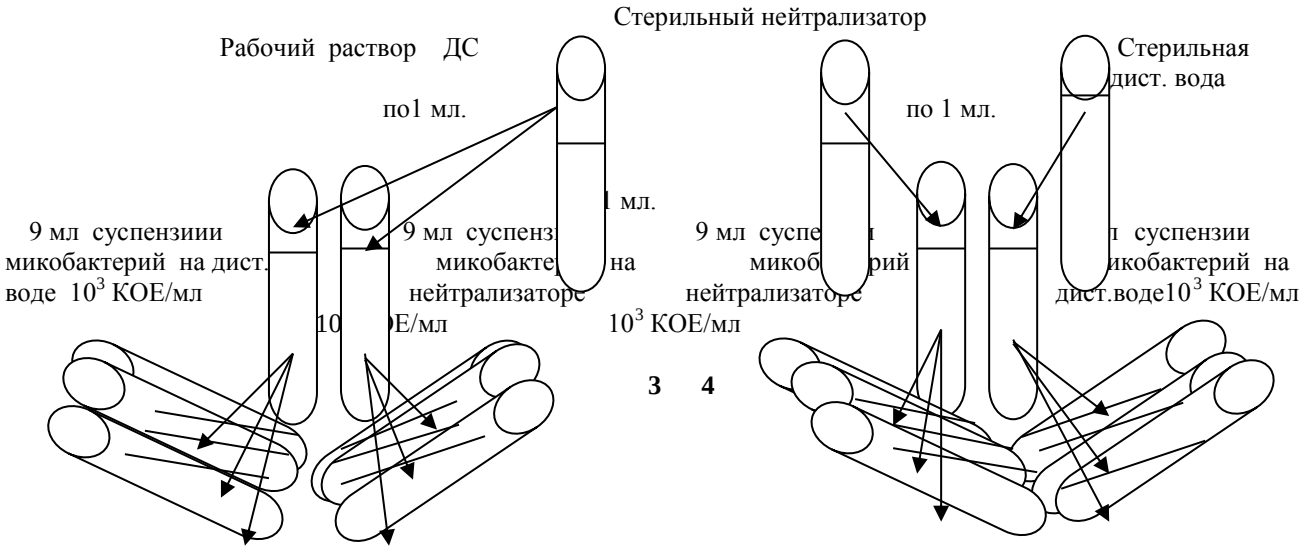
Несмотря на существующие рекомендации по применению нейтрализаторов для различных действующих веществ (ДВ), многие современные ДС содержат несколько ДВ и другие вспомогательные вещества, обладающие бактериостатическим действием, и существующие (рекомендуемые) нейтрализаторы могут не обеспечивать эффективной нейтрализации остаточного действия ДС в пробе. В этой связи, результаты оценки эффективности ДС могут быть необъективными.

Поэтому каждый случай проведения испытания ДС должен предварительно сопровождаться экспериментальным контролем эффективности нейтрализации остаточного действия ДС на микробную клетку.

Для контроля эффективности нейтрализатора и полноты нейтрализации ДС используют суспензионный метод, предусматривающий проведение исследования, основные операции которого и их назначение приведены на схеме 1.3 и в таблице 1.6.

Схема 1.3.

Проведение эксперимента по контролю эффективности нейтрализации действия ДС на микобактерии используемым нейтрализатором



Пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая»

Таблица 1.6.

Назначение операций эксперимента по оценке эффективности нейтрализации остаточного действия ДС

№ пробы	Назначение операции исследования	Процедура выполнения операции исследования	Ожидаемый результат
1.	Контроль губительного действия ДС	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на дист. воде + 1 мл раствора ДС	Рост микроорганизмов должен отсутствовать
2.	Контроль полноты нейтрализации ДС	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора дезсредства	Примерно одинаковое количество колоний в посевах

3.	Контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора нейтрализатора	проб (по 0,1 мл) на плотной питательной среде
4.	Референс - контроль количества микобактерий	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на дист. воде + 1 мл дист. воды	
Примечание: спустя 5 минут после постановки опыта, из каждой из четырех проб производят посев смеси по 0,1 мл, как минимум, на 3 пробирки со скошенной питательной средой, которые инкубируют в термостате при 37^0С, по истечении 14-21 суток учитывают результаты исследований.			

1.2.2 Методы исследований и оценки результатов активности ДС и их субстанций in vitro

1.2.2.1 Суспензионный метод

Суспензионный метод оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций используют для получения первичной информации о концентрационных и временных параметрах эффективного (отсутствие жизнеспособных микобактерий) туберкулоцидного действия ДС. Методология выполнения эксперимента по оценке туберкулоцидной активности ДС суспензионным методом приведена на схеме рисунка 1.4.

Как видно из схемы 1.4, для проведения опыта по оценке туберкулоцидных свойств дезинфицирующего средства суспензионным методом необходимо приготовить:

рабочую суспензию штамма тест-микобактерий с концентрацией не менее 1·109 КОЕ/мл;

пробирки со стерильной питьевой водой для проведения контроля реальной биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии, используемой в опыте;

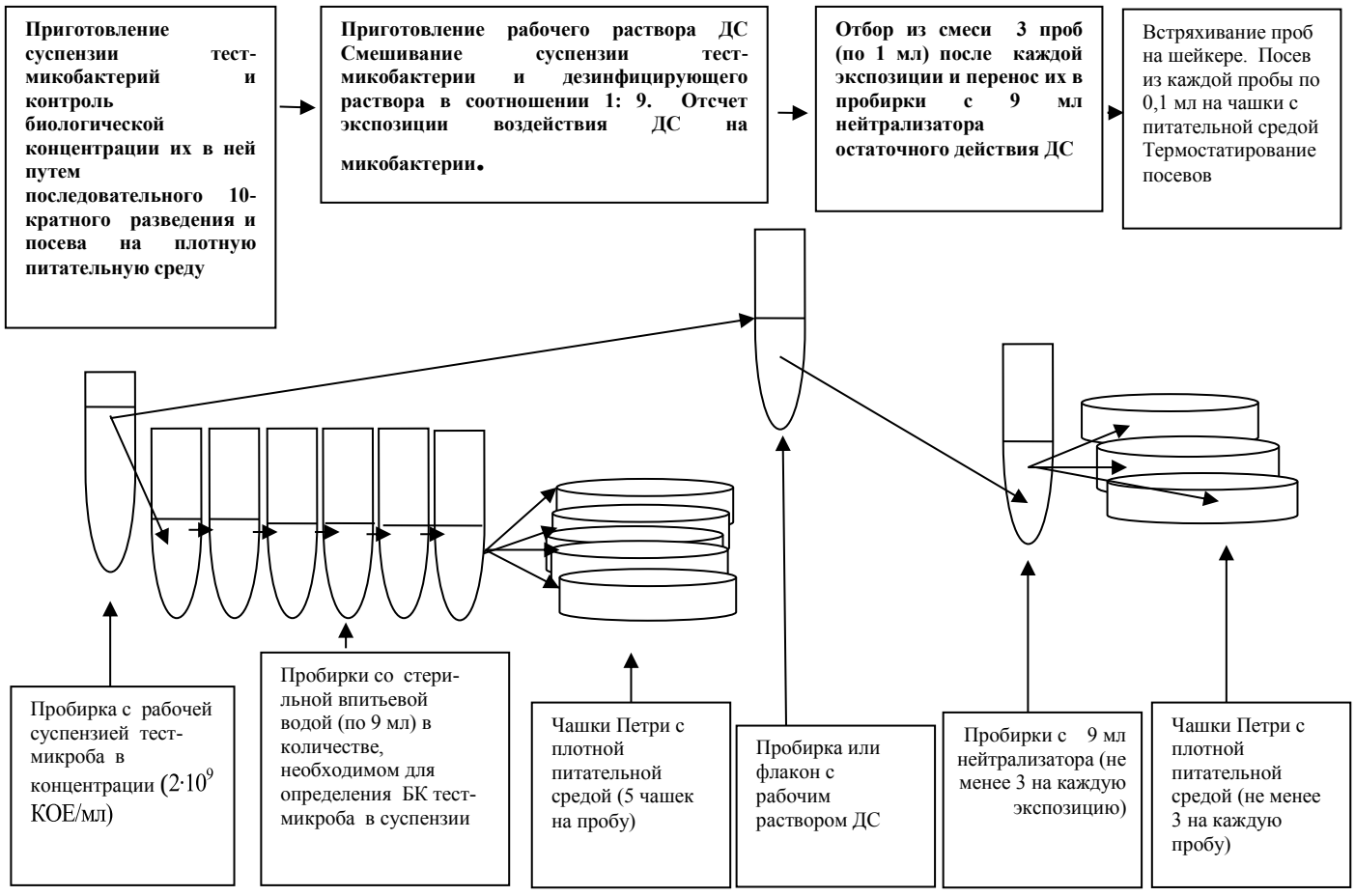
пробирки или флакон с раствором ДС в испытываемой концентрации в количестве, необходимом для обеспечения отбора всех проб;

необходимое количество пробирок (в зависимости от количества проб, отбираемых для определения времени, обеспечивающего полную гибель тест-микроба), содержащих по 9 мл нейтрализатора, проверенного предварительно на эффективность нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС (п. 1.1.2.3.);

пробирки со скошенной стерильной плотной питательной средой в количестве, необходимом для посева пробы контроля исходной суспензии и проб контроля эффективности действия ДС на тест-микроб.

Схема 1.4.

Проведение эксперимента по оценке туберкулоцидной активности ДС суспензионным методом



Методика проведения самого опыта включает, как видно из схемы, последовательное выполнение следующих операций:

тщательное перемешивание хранимой в пробирке или во флаконе рабочей суспензии тест-микроорганизма путем встряхивания ее в течение 2-3 мин.;

помещение испытываемого рабочего раствора ДС в водяную баню с заданной температурой; если задачей эксперимента не предусмотрено изучения влияния воздействия температуры на эффективность средства, то оценка эффективности раствора испытываемого средства осуществляется при температуре 18-20°С;

проведение контроля реальной на момент проведения опыта биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии;

внесение в испытываемый дезинфицирующий раствор рабочей суспензии тест-микроорганизма с обеспечением соотношения ДС и суспензии тест-микроорганизма 9:1;

перемешивание смеси и отсчет по секундомеру времени начала воздействия ДС на тест-микроорганизм;

по окончании каждой заданной экспозиции проведение отбора пробы в количестве 3 мл, которую по 1 мл вносят в 3 пробирки, содержащих по 9 мл стерильного раствора нейтрализатора остаточного действия дезинфекционного средства на тест-микроорганизм;

перемешивание пробы путем встряхивания вручную в течение 1-2 мин. (или в течение 5 мин. на шейкере) и посев из них стерильно на поверхность плотной питательной среды в чашках Петри или в пробирках (по 0,1 мл на каждую чашку или пробирку, но не менее чем на три из каждой пробы).

инкубирование посевов проб при температуре 37±1°С в течение 14-21 суток и учет результатов.

Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие жизнеспособных клеток в посевах соответствующих им проб.

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин. полную гибель микобактерий, рассматривают как перспективное туберкулоцидное средство для дальнейшего изучения: оценки факторов, влияющих на туберкулоцидную активность ДС, отработки режимов эффективного применения и др.

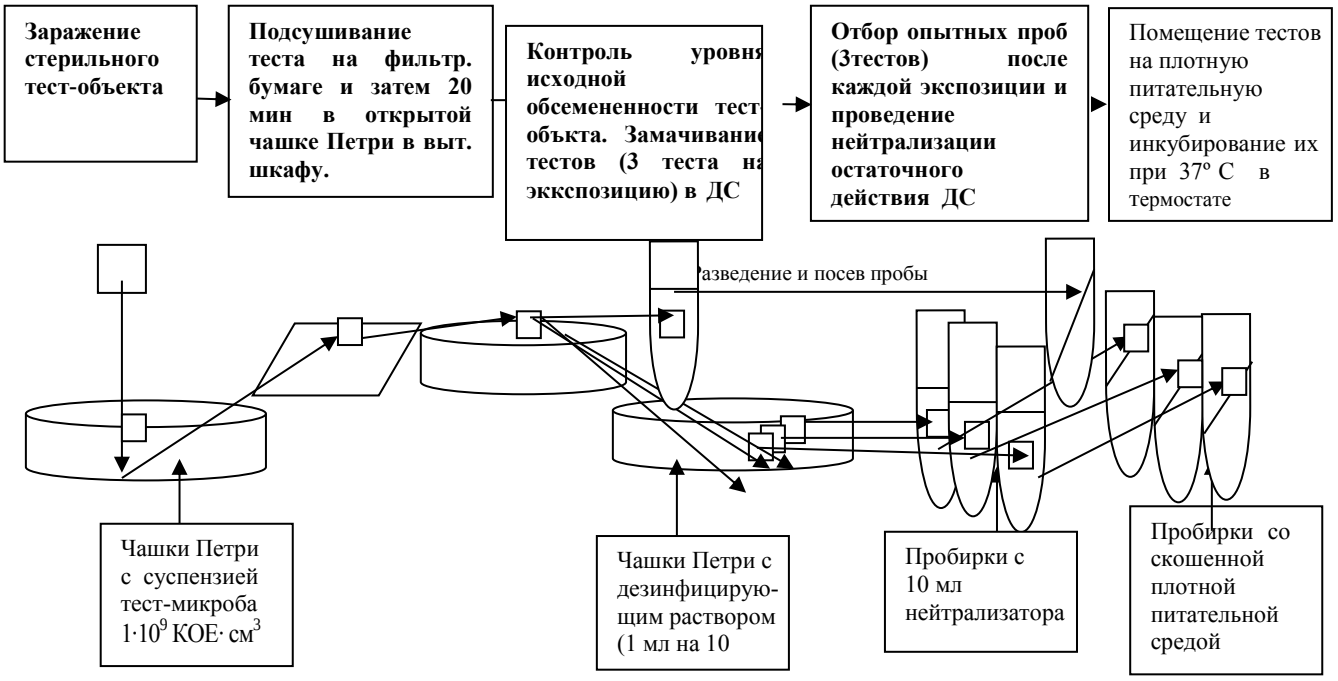
1.2.2.2. Метод батистовых тест-объектов

Как суспензионный метод оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций, так и метод батистовых тест-объектов используют для получения информации о концентрационных и временных параметрах эффективного туберкулоцидного действия ДС. В принципиальном плане методология выполнения эксперимента по оценке (тестированию) туберкулоцидной эффективности ДС методом батистовых тест-объектов приведена на схеме 1.5.

Как видно из схемы 1.5., методика эксперимента предусматривает проведение контаминации микобактериями батистовых тест-объектов, контроля исходного уровня обсеменения тест-объектов, обработки (замачивания) тест-объектов в испытываемом дезинфицирующем растворе, нейтрализации ДС после заданной экспозиции воздействия, инкубирование нейтрализованных тест-объектов на плотной питательной среде.

Схема 1.5.

Выполнение эксперимента по оценке туберкулоцидной активности дезинфекционного средства методом батистовых тест-объектов



Приготовление и контаминация батистовых тест-объектов.

Батистовую ткань погружают на 24 часа в холодную питьевую воду для удаления аппрета. Затем ткань тщательно стирают с мылом, прополаскивают в холодной воде, кипятят, сушат и гладят горячим утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске батистовой ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 10 мм друг от друга и в поперечном – на расстоянии 0,5 см. По этим линиям ткань разрезают ножницами на отдельные тест-объекты; раскладывают по 50 штук в чашки Петри, которые завертывают в бумагу и автоклавируют в паровом стерилизаторе 20 мин. при 132°С (1,1 кгс/см^2).

Приготавливают рабочую суспензию тест-микобактерий (п.1.2.1.2.) в количестве, достаточном для контаминации используемых в опыте тест-объектов (из расчета 0,2 мл на тест).

Стерильные батистовые тест-объекты (в количестве 50-100 штук) в чашке Петри заливают 10-20 мл рабочей суспензии тест-микобактерий, содержащей 10^9 КОЕ/мл, и равномерно смачивая, оставляют тест-объекты в суспензии в закрытой чашке Петри. Через 30 мин. тест-объекты, контаминированные бактериальной суспензией, стерильным пинцетом с соблюдением асептики переносят в стерильную чашку Петри на поверхность двухслойной стерильной фильтровальной бумаги, покрывают их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывают чашку. Оставляют на 10 мин. с целью удаления избытка жидкости. Для фиксации микроорганизмов на батистовых тест-объектах, последние переносят на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывают стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 20 мин. с приоткрытыми крышками.

Хранение контаминированных тест-объектов возможно в холодильнике при температуре 4±2°С в течение суток.

Контроль исходного количества живых тест-микобактерий на тест-объекте

Для контроля количества жизнеспособных микобактериальных клеток на тест-объектах, тест-объект погружают в колбу со 100 мл стерильной питьевой воды. Колбу устанавливают на шейкер и встряхивают в течение 30 мин. для отмывания бактериальных клеток с бязевого (батистового) тест-объекта. Из полученной суспензии производят посев по 0,1 мл на 5 пробирок (5 повторностей) со средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», инкубируют в термостате при 37°С

в течение 14-21 суток. Выросшие колонии на поверхности питательной среды подсчитывают, определяют среднее значение, производят пересчет с учетом разведения. Количество жизнеспособных бактериальных клеток в приготовленной суспензии на тест-объекте должно составлять 10^5-10^6 микробных тел (если рост микобактерий отсутствует, при посеве суспензии объемом 0,1 мл, можно увеличить объем до 0,2-0,3 мл и соответственно учесть его при расчете бактериальной концентрации на тест-объекте).

Расчет концентрации живых микобактерий на тест-объекте осуществляют по следующей формуле:

X = A x 1000, где

X – концентрация живых микобактерий на тест-объекте;

A – среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках;

1000 – коэффициент, полученный от соотношения 100 мл (общий объем пробы в колбе) к 0,1 мл (объем пробы, использованный для посева).

Например:

получен рост микобактерий в первой пробе – 50 КОЕ, во второй – 110 КОЕ, в третьей – 98 КОЕ, в четвертой – 150 КОЕ, в пятой – 100 КОЕ, тогда среднее количество колонне образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках будет равно:

A = (50+110+98+150+100):5 = 102

X = 102×1000 = 1020000, что соответствует 1 млн. живых микробных клеток на тест-объекте.

Проведение обработки тест-объектов раствором испытуемого ДС и контроль эффективности обеззараживания

Стерильным пинцетом погружают необходимое для проведения эксперимента количество контаминированных тест-штаммом микобактерий тест-объектов в пробирку или чашку Петри с раствором ДС (объем ДС должен рассчитываться с учетом соотношения 1,0 мл раствора на 1 тест-объект), обеспечивая полное смачивание (погружение) тест-объектов, фиксируют время начала экспозиции и следят за соблюдением температурного режима (20±2°С).

По истечении заданного времени экспозиции, стерильным пинцетом извлекают тест-объект из раствора ДС и погружают его на 1-2 мин. в пробирку со стерильным раствором нейтрализатора при температуре 20±2°С (пробирку с раствором нейтрализатора и погруженным в него тестом не встряхивают).

Затем при помощи пинцета размещают тест-объект на скошенную поверхность питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» (на скошенную площадку питательной среды в пробирке можно разместить 3 тест-объекта, что позволяет увеличить без дополнительных затрат количество проб на каждую экспозицию, а значит, и достоверность результатов оценки эффективности средства). Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, помещают в термостат в наклонном положении под углом 30º таким образом, чтобы стекающий с теста посевной материал тоже равномерно распределился по поверхности питательной среды, и инкубируют при 37±1°С в течение 10-21 дня с ежедневным просмотром.

Учет и анализ результатов эксперимента

Учет результатов посевов проводят визуально путем подсчета выросших колоний на самом тест-объекте и на поверхности

питательной среды. Колонии M. terrae на среде Левенштейна-Йенсена представляют собой шероховатые и матовые выпуклые округлые образования, на среде «Новая» – гладкие и блестящие или с молочным или желтоватым оттенком.

Наличие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды показывает, что тестируемое ДС в данном режиме применения (концентрация раствора и экспозиция воздействия) не обеспечивает надежного туберкулоцидного эффекта.

Отсутствие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды свидетельствует о наличии у средства в данном режиме (концентрация раствора и экспозиция воздействия) туберкулоцидной эффективности, отвечающей предъявляемым требованиям к ДС для практического их использования (обеспечение снижения уровня обсемененности объекта на 10^5 КОЕ·см^2).

Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие в посевах соответствующих им проб жизнеспособных микобактерий.

Количество и интервал (шаг) экспозиций, при которых осуществляется отбор проб на эффективность ДС, выбирают на основе данных о составе и эффективности входящих в средство действующих веществ.

Средство, растворы которого обеспечивают при температуре 20±2°С в течение 60 мин. полную гибель микобактерий тест-микроорганизма, может рассматриваться как перспективное туберкулоцидное ДС для дальнейшего изучения: оценки факторов, влияющих на туберкулоцидную активность ДС, отработки режимов эффективного применения и др.

1.2.2.3 Методы изучения факторов, влияющих на туберкулоцидную активность ДС и их субстанций

Для определения условий применения и направлений дальнейших исследований необходимо изучить зависимость туберкулоцидного действия ДС от температуры раствора ДС, величины pH и присутствия белковых загрязнений.

Исследования проводят методом батистовых тест-объектов (п.1.2.2.2.).

Определение влияния температуры на туберкулоцидную активность ДС и их субстанций проводят с целью выявления возможности использования подогретых растворов ДС для сокращения времени обеззараживания объектов в отношении микобактерий туберкулеза, а также для оценки эффективности туберкулоцидных свойств при пониженных температурах окружающей среды, обеззараживаемого объекта и самого раствора ДС.

Для изучения влияния температуры рабочие растворы испытуемых ДС готовят в день опыта, наливают в стеклянные колбы (пробирки) из расчета по 0,5 мл на каждый тест-объект.

Исследование влияния положительных температур раствора ДС на его туберкулоцидную активность проводят с использованием водяной бани, в которой нагревают емкость с дезинфицирующим раствором до 18±1°С, 37±1°С, 55±1°С, после чего погружают в него зараженные тест-объекты и поддерживают эти температуры в процессе всего опыта.

Опыты по оценке влияния пониженной температуры на активность ДС проводят с использованием криостата или солевых низкозамерзающих растворов, в которых охлаждают емкость с дезинфицирующим раствором до 10±1°С, 5±1°С, минус 2±1°С и поддержания их в процессе опыта. После достижения указанной

температуры в раствор ДС погружают батистовые тест-объекты, контаминированные культурой тест-микроорганизма из расчета 2 тест-объекта на каждую экспозицию.

Через определенные промежутки времени из каждой колбы извлекают по 2 тест-объекта и помещают их при температуре 20±1°С в пробирки с соответствующим нейтрализатором на 5 мин., затем во вторую пробирку со стерильной водой на 5 мин. и только после этого каждый тест-объект переносят в пробирку со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» и укладывают его на поверхность среды. Посевы инкубируют в течение 14-21 суток при 37±1°С. Контролем служат по 2 тест-объекта при каждой исследованной температуре, не подвергавшиеся действию испытуемого ДС, но погруженные в пробирки со стерильной питьевой водой на срок, равный действию испытуемого ДС.

Определение влияния величины pH на туберкулоцидную активность ДС и их субстанций начинают с приготовления рабочих растворов ДС, имеющих различную величину pH. Для подкисления раствора используют децинормальный раствор соляной или другой кислоты, а для подщелачивания – децинормальный раствор щелочи. В подготовленные растворы погружают контаминированные микобактериями батистовые тест-объекты. Исследование зависимости туберкулоцидной активности ДС и их субстанций от величины pH проводят по методике, описанной выше, только при нейтрализации действия действующих веществ одновременно понижают или повышают и величину pH, добавляя соответственно кислоту или щелочь.

Определение влияния белковых загрязнений на туберкулоцидную активность ДС проводят с целью выявления возможности влияния (или

установления его отсутствия) белковых загрязнений на обеззараживаемом объекте на туберкулоцидную активность ДС.

Исследование проводят методом батистовых тест-объектов (п. 1.2.2.2.), только для контаминации тест-объектов используют суспензию тест-микобактерий, содержащую 20,0% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови, которые добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию нормальной сыворотки крупного рогатого скота проводят дробным трехкратным прогреванием на водяной бане при температуре 60±1ºС в течение 30 мин. Если активность препарата не снижается в присутствии 20,0% белка, концентрацию инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови в суспензии тест-микроорганизма увеличивают до 40,0%. Отсутствие снижения туберкулоцидной активности ДС при добавлении 40,0% сыворотки позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

1.2.3 Методы исследований туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами

Перечень тест-объектов, моделирующих объекты, подлежащие дезинфекции, включает: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и др.; изделия медицинского назначения, в том числе эндоскопы; предметы ухода за больными, игрушки; посуду, включая лабораторную и из-под выделений; белье, одежду, спецодежду и другие объекты из тканей; изделия из резины, в том числе перчатки, сапоги, фартуки и др.; обувь; руки в резиновых перчатках; остатки пищи;

выделения: фекалии, мочу, кровь, мокроту; воду; воздух; медицинские отходы.

1.2.3.1 Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и других объектов

В исследованиях используют тест-поверхности (10х10 см) из различных материалов: дерева (неокрашенного, окрашенного масляной, клеевой или другими красками, оклеенного обоями), линолеума, пластика, кафеля, фаянса, плитки, металлов, стекла.

Тест-поверхности из различных материалов (за исключением деревянных тест-поверхностей, окрашенных клеевой краской и оклеенных обоями) тщательно моют водой с мылом и щеткой, стерилизуют в паровом стерилизаторе (при температуре 121±1°С в течение 30 мин.). Тест-поверхности, окрашенные клеевой краской и оклеенные обоями, протирают несколько раз стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой. Готовят суспензию тест-микобактерий, содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ КОЕ /мл. При разработке режимов обеззараживания раковин, ванн и других загрязненных объектов для имитации органического загрязнения к суспензии добавляют 40,0% лошадиной сыворотки, инактивированной при 56°С в течение 30 мин. (к 6 мл 2-миллиардной суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

После подсыхания тест-поверхности располагают горизонтально и на них с помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки наносят 0,5 мл суспензии тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по тест-поверхности (100 $см^2$) стерильным стеклянным шпателем. Если суспензия тест-

микроорганизма не распределяется равномерно, а собирается в каплю, растирание шпателем по тест-поверхности осуществляют неоднократно (3-5 раз). Контаминированные тест-поверхности подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30-120 мин.). Обеззараживание тест-поверхностей осуществляют способами протирания, орошения дезинфицирующим раствором.

При обеззараживании тест-поверхности из дерева (окрашенные клеевой и другими красками, оклеенные обоями), из стекла, кафеля и др. располагают вертикально; поверхности из линолеума, метлахской плитки и других покрытий для пола располагают горизонтально. Тест-поверхности обеззараживают путем их орошения, протирания (однократного или двукратного) дезинфицирующим раствором.

В зависимости от вида обрабатываемой поверхности и наличия загрязнений на ней, норма расхода ДС на одну обработку способом протирания составляет 100-150 мл на $м^2$ (1-1,5 мл на 100 $см^2$); способом орошения – 150 мл на $м^2$ (1,5 мл на 100 $см^2$) при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 мл на $м^2$ (3 мл на 100 $см^2$) – при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом.

При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5-15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени (15-30-60 и т.д. до 120 мин.) с тест-поверхностей делают смывы путем тщательного протирания поверхности стерильной марлевой салфеткой (5 $см^2$), увлажненной нейтрализатором. После протирания на тест-поверхности не должно оставаться излишней влаги. Салфетки погружают на 5 мин. в пробирки (емкости) с соответствующим нейтрализатором (10 мл), а затем в стерильную питьевую воду с бусами и встряхивают на шейкере

в течение 10 мин. Полученную смывную жидкость вносят по 0,1 мл в 3-5 пробирок со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», тщательно распределяя ее по всей поверхности. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С в течение 10-21 суток.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных тест-поверхностей вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду из того же расчета, что и опытные. Жидкость, в которую помещают стерильную марлевую салфетку после взятия смыва с контрольных поверхностей, перед посевом разводят в 100 раз и вносят по 0,1 мл на скошенную поверхность плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» 3-5 пробирок. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С. Учитывают результаты через 10-21 суток.

Оценку результатов проводят по посеву того разведения, в котором число колоний на чашке Петри или в пробирке составляет от 30 до 300.

После выдерживания посевов в термостате подсчитывают число колоний на чашках или пробирках с плотной питательной средой, рассчитывают остаточную плотность контаминации на 100 $см^2$ тест-поверхности и высчитывают эффективность обеззараживания, принимая количество тест-микроорганизмов, снятых с контрольных тест-объектов (тест-поверхностей), за 100 %.

Например:

на 100 $см^2$ контрольной тест-поверхности по результатам бактериологического контроля обнаружено 148000 микробных клеток, а на аналогичного вида опытной тест-поверхности – 20 микробных клеток.

148000 – 100 % x = 20x100:148000 = 2:148 = 0,013 %

20 – x

Эффективность обеззараживания опытной тест-поверхности составляет:

100 – 0,013 = 99,987 %.

Критерий эффективности ДС при обеззараживании тест-поверхностей из различных материалов, контаминированных тест-микроорганизмом равна не менее 99,99 %.

1.2.3.2. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких)

В исследованиях используют тест-объекты (100 $см^2$) и предметы ухода за больными из различных материалов: резин на основе натурального и силиконового каучука (медицинская клеенка, грелка, груша); стекла (поильник; плевательница; градусник); пластмасс (грелка, лоток; наконечник для клизм); металлов (таз, стакан для термометра); игрушки (кроме мягких) из резин и пластмасс.

Тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки из различных материалов тщательно моют водой с мылом и щеткой. Тест-объекты стерилизуют паровым или воздушным методом.

Готовят суспензию тест-микобактерий, содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ КОЕ $\cdot$ $мл^{-1}$. К суспензии добавляют 40,0% лошадиной сыворотки, инактивированной при 56°С в течение 30 минут (к 6 мл 2-миллиардной суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

С помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки на поверхность тест-объекта наносят 0,5 мл суспензии тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют

по поверхности (100 см^2) стерильным стеклянным шпателем. Каналы и полости предмета ухода за больными, игрушек заполняют с помощью шприца. Мелкие игрушки полностью погружают в суспензию. Контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30-120 мин.).

Растворы ДС готовят на водопроводной воде температуры 20±2ºС. Обеззараживание осуществляют способом погружения, протирания, орошения. После подсушивания контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными, игрушки, в том числе имеющие каналы и полости, погружают в раствор испытуемого дезинфицирующего средства или протирают салфеткой, смоченной им. Мелкие игрушки полностью погружают в емкость с раствором ДС, препятствуя их всплытию; крупные игрушки обеззараживают способом орошения. Норма расхода ДС способом протирания из расчета 100-150 мл/м^2 при однократной обработке и 200-300 мл/м^2 при двукратной; способом орошения – 150 мл/м^2 при обработке распылителем типа «Квазар», при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом – 300 мл/м^2. При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5-15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени после обработки (30-60-120 мин.) тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки извлекают из раствора, делают смывы стерильной марлевой салфеткой (5 см^2), увлажненной нейтрализатором. Салфетки погружают в стерильный раствор нейтрализатора на 5 мин., затем переносят в пробирки (емкости) с бусами и стерильной питьевой водой (10 мл) и встряхивают на шейкере в течение 10 мин.. Каналы и полости промывают

нейтрализатором (10 мл), который собирают в стерильные пробирки (емкости) и оставляют на 5 мин. для нейтрализации.

Полученную смывную жидкость и смывную жидкость из каналов вносят по 0,1 мл на скошенную поверхность плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» 3-5 пробирок. В контрольных опытах вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду.

Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С.

Результаты учитывают через 10-21 сутки инкубирования.

Эффективности ДС при обеззараживании тест-объектов, предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких), контаминированных тест-микроорганизмом должна быть не менее 100%.

1.2.3.3 Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды столовой, лабораторной и из-под выделений

Для определения туберкулоцидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды, используют в качестве тест-объектов набор столовой и чайной посуды: тарелки, стаканы, кружки из различного материала (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью); столовые приборы: ножи, вилки, ложки из различного материала (нержавеющая сталь, алюминий, пластик), посуду одноразового использования и набор лабораторной посуды, представляющий тест-объекты из стекла и пластмасс: предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического анализа и другое; посуда из-под выделений (мочеприемники, подкладные судна). Перед экспериментом посуду и столовые приборы моют водой с мылом и щеткой и высушивают.

На посуду (площадь в 100 $см^2$) пипеткой наносят суспензию тест-микроорганизма из расчета 0,5 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ в 1 мл. Суспензию тест-микроорганизма равномерно распределяют по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы для контаминации погружают в бактериальную суспензию на 1-2 мин., оставляя незараженными их ручки. Контаминированную посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре (30-120 мин.) и относительной влажности воздуха 50-60 %.

Для разработки режимов обеззараживания посуды с остатками пищи при контаминации используют суспензию тест-микроорганизма, смешанную с овсяной, манной или другой кашей, сваренной на молоке со сливочным маслом (к 10 г каши добавляют 1 мл 2-миллиардной микробной взвеси). Для имитации загрязнения чайной посуды используют кисель (к 10 г киселя добавляют 1 мл 2-миллиардной микробной взвеси), лабораторной посуды – 40,0% инактивированной сыворотки, посуды из-под выделений – 20,0% эмульсию фекалий, предварительно растертую в ступке.

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды, столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор. Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора 18-20°С. При необходимости изучают эффективность растворов ДС при температуре 50°С.

Дезинфицирующий раствор должен полностью заполнять и с избытком покрыть всю посуду и приборы (из расчета не менее 2 л на 1 комплект).

Время обеззараживания посуды – от 15 до 240 мин., в зависимости от вида ДС и наличия загрязнения.

Через определенные интервалы времени (например, 15, 30, 60 мин. и т.д.) извлекают по одному предмету разных наименований (например, тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т.д.) из дезинфицирующего раствора и стерильной марлевой салфеткой (5 $см^2$), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС, тщательно протирают зараженную часть каждого предмета и погружают в 10 мл этого же нейтрализатора на 5 мин., затем салфетку переносят в пробирку со стерильной питьевой водой и бусами. Время отмыва марлевой салфетки – 10 мин. при постоянном встряхивании на шейкере. После отмыва смывную жидкость по 0,1 мл высевают в 3-5 пробирки со скошенной поверхностью плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» (по 0,1 мл в каждую). Посевы помещают в термостат при температуре 37±1°С. Предварительный учет результатов проводят через 10-14 суток, окончательный – через 21 сутки.

Контролем служит аналогично контаминированная посуда, которая погружается не в дезинфицирующий раствор, а в такой же объем стерильной питьевой воды.

Критерий эффективности обеззараживания посуды: гибель тест-микроорганизма не менее 100 %.

1.2.3.4 Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий (МИ), включая эндоскопы

1.2.3.4.1. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий (кроме эндоскопов)

В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и другие МИ, в том числе однократного применения, из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их

тест-объекты. Перечень инструментов, должен включать разнообразные по форме, характеру поверхности и используемому материалу изделия (гладкие изделия простой конфигурации; изделия, имеющие замковые части, каналы и полости, имеющие насечки и напыления, изделия извитой формы; изделия, изготовленные из нескольких видов материалов и т.д.).

На рабочую поверхность тест-изделия (у замковых изделий - также в область замка, а при наличии каналов и полостей - также в канал изделия) наносят 0,1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл тест-микроорганизма, содержащей 40% инактивированной лошадиной сыворотки. Мелкие тест-изделия для контаминации погружают в эту суспензию на 15 мин. Контаминированные тест-изделия подсушивают в термостате в течение 20-25 мин. Дезинфицирующие растворы готовят на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до 50±1°С.

После подсушивания контаминированные изделия погружают в раствор испытываемого средства, 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 изделия в области замка. Толщина слоя раствора средства над изделиями должна быть не менее 1 см. Параллельно контаминированные контрольные изделия погружают в воду.

Через определенное время (от 15 до 120 мин.) изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой размером 5×5 см, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора на 5 мин., затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой водой и встряхивают с

бусами в течение 5-10 мин. Для контроля эффективности обеззараживания делают посев смывной жидкости по 0,1 мл на поверхность агаровой питательной среды, а салфетку помещают в бульон. Канал изделия промывают нейтрализатором, и смывную жидкость засевают по 0,1 мл на скошенную плотную питательную среду в 3-5 пробирках. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37±1°С в течение 21 суток. Учет предварительных результатов проводят через 10-14 суток и окончательных – через 21 сутки.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий 100 % гибель тест-микроорганизмов на всех изделиях. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая концентрацию или время воздействия.

1.2.3.4.2. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов

В качестве тест-объектов используют фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий - гастроскоп, жесткий - цистоскоп). По 0,1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл тест-микроорганизмов, наносят с помощью пипетки на наружную поверхность и в канал эндоскопа, подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя полости и каналы эндоскопа. Через определенное время (от 15 до 60 мин.) изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной в растворе нейтрализатора; салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же стерильного раствора нейтрализатора на 5 мин., а затем

переносят ее в пробирку со стерильной питьевой воды, и встряхивают с бусами в течение 5-10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора и смывную жидкость засевают на питательный агар. Проводят также контроль микробной обсемененности использованных для отмыва проб раствора нейтрализатора и питьевой воды. Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех тест-изделиях и отсутствие тест-микроорганизмов в растворе нейтрализатора. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более чем до 60 мин.

Положительной считается проба, показывающая характерный рост тест-микроорганизма на плотных питательных средах или обнаружение тест-микроорганизма в растворе применявшегося нейтрализатора.

Режим обеззараживания, разработанный на имитаторах канала эндоскопа, проверяют при обеззараживании эндоскопа, контаминированного тест-микроорганизмом. При необходимости эффективность разработанного режима проверяют в практических условиях.

Критерием эффективности ДС (режим применения ДС) при обеззараживании ИМН (включая эндоскопы) является 100 % гибель тест-микроорганизма.

Исследование туберкулоцидной эффективности ДС при дезинфекции высокого уровня эндоскопов

Данная методика предназначена для разработки режимов дезинфекции высокого уровня эндоскопов при проведении «нестерильных» диагностических и лечебных манипуляций.

Для исследования выбирают ДС, обладающее спороцидным действием, и испытания его проводят при тех же условиях (концентрация, температура), которые обеспечивают гибель спор бацилл, определяя необходимое время дезинфекционной выдержки для достижения гибели наиболее устойчивого к изучаемому ДС микроорганизма.

При определении эффективности средств для ДВУ эндоскопов в качестве тест-объектов используют фрагменты канала гибкого эндоскопа или его имитаторы в виде трубок из пластика длиной 2 см, диаметром 2 мм.

Стерильные тест-объекты искусственно контаминируют, нанося с помощью дозатора/микропипетки в центральную часть канала и на поверхность каждой трубки суспензию тест-микроорганизма из расчета: 106 микробных клеток тест-микобактерий на каждое изделие. Для имитации органического загрязнения к суспензии микроорганизмов перед контаминацией объекта добавляют 2% инактивированной лошадиной сыворотки.

Контаминированные тест-объекты подсушивают при комнатной температуре 18-22°С в течение 20 мин.

Дезинфицирующий раствор готовят на стерильной водопроводной (питьевой) воде. Обработку исследуемым ДС осуществляют способом погружения в испытуемый дезинфицирующий раствор. Через определенные интервалы времени, зависящие от химического состава средства, в промежутке от 5 до 60 мин., тест-изделия извлекают из дезинфицирующего раствора, помещают на 5-10 мин. в раствор соответствующего нейтрализатора. После отмыва смывную жидкость по 0,1 мл высевают в 3-5 пробирок со скошенной питательной средой для проверки эффективности обеззараживания.

Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста использованного тест-микроорганизма: для тест-микобактерий – 37±1°С и 21 сутки, после чего проводят учет результатов эксперимента.

В качестве контроля используют тест-объекты, контаминированные как указано выше и помещенные в воду на время дезинфекционной выдержки.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех тест-изделиях при отсутствии его роста в питательной среде. Положительной считается проба с характерным ростом микроорганизма на плотной питательной среде, или обнаружение микроорганизмов в растворе применявшегося нейтрализатора. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более чем до 60 мин.

При необходимости эффективность разработанного режима проверяется в практических условиях.

Критерий эффективности обеззараживания – 100% гибель тест-микроорганизма.

Время обеззараживания – не более 60 мин.

1.2.3.5. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани

Исследования с ДС проводят в целях оценки эффективности его для обеззараживания белья и других объектов из ткани, чистых и загрязненных кровью или выделениями (фекалии, моча, мокрота).

Оценку эффективности ДС для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани осуществляют с помощью стерильных тест-объектов, представляющих собой кусочки бязи размером 2×2 см. Бязь предварительно готовят и обеззараживают также как батист. Контаминируют стерильные тест-объекты суспензией тест-микроорганизмов, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, из расчета 20 мл на 10 тест-объектов и подсушивают в течение 30 мин. Затем тест-объекты закладывают в бязевые мешочки размером 5×8 см (по 2 шт. в каждый), которые закрывают в виде конверта.

Раствор испытываемого ДС на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до 50±1°С готовят из расчета 5 л на 1 кг белья. Ветошь, имитирующую белье, поштучно погружают в емкость с раствором испытываемого ДС так, чтобы между слоями ткани не образовывалось воздушных прослоек, препятствующих процессу обеззараживания. Одновременно между слоями белья распределяют (сверху, в середине и внизу) мешочки с контаминированными тест-объектами. Через заданное время мешочки извлекают одновременно из трех слоев. Тест-объекты вынимают из мешочка стерильным пинцетом, помещают на 5 мин. в емкость с раствором соответствующего нейтрализатора, затем переносят в стерильную питьевую воду и высевают на питательный агар. Посевы инкубируют при 37±1°С. Предварительный учет результатов проводят через 10-14 суток, а

окончательный – через 21 сутки. В контрольных опытах белье погружают в стерильную питьевую воду. Мешочки с тестами закладывают так же, как и в опыте. При получении 100 % гибели тест-микроорганизма в опытах по обеззараживанию белья без белковых загрязнений переходят к опытам по обеззараживанию белья, загрязненного выделениями.

Для определения эффективности ДС при обеззараживании белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани, загрязненных кровью, выделениями (фекалии, мокрота, моча и др.), в лабораторных условиях используют бязевые тест-объекты, которые контаминируют суспензией тест-микобактерий с добавлением 40% инактивированной сыворотки (6 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл тест-микроорганизма смешивают с 4 мл инактивированной сыворотки) или 40% фекальной эмульсии (6 мл суспензии тест-микроорганизма смешивают с 4 мл 40 % фекальной эмульсии) исходя из расчета 30 мл суспензии на 10 тест-объектов. Для приготовления фекальной эмульсии 8 г фекалий растирают в ступке с 20 мл воды. Количество суспензии тест-микроорганизма, содержащей сыворотку или фекалии, готовят из расчета 30 мл на 10 тест-объектов. Контаминированные тест-объекты подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 20-25 мин. или 1,5-2 ч при комнатной температуре до полного высыхания. Методика проведения эксперимента аналогична опытам с чистым бельем.

Критерием эффективности ДС при обеззараживании белья, одежды, спецодежды и других объектов из тканей является 100 % гибель тест-микроорганизмов на тест-объектах.

При изучении эффективности обеззараживания изделий из синтетических тканей (капрон, ацетат, лавсан и др.) используют тест-объекты из этих тканей размером 5×5 см, т.к. микроорганизмы не

проникают в структуру этих тканей и смываемость их в 2 раза больше, чем с бязевых тест-объектов.

1.2.3.6. Исследование туберкулоцидной эффективности камерного метода обеззараживания

Камерный метод используют для обеззараживания одежды, обуви, постельных принадлежностей, мягких игрушек и др.

В качестве тест-микроорганизма используют Mycobacterium B5 в виде суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ в 1 мл, которой контаминируют тест-объекты из батиста, бязи и других материалов, соответствующих обеззараживаемым объектам. Тест-объекты закладывают в стерильные конверты из хлопчатобумажной ткани (по 2 тест-объекта в конверт). Пронумерованные тест-объекты помещают в хлопчатобумажные мешочки с максимальными термометрами и размещают в толще объектов в контрольные точки камеры на трех уровнях.

После обеззараживания мешочки извлекают из камеры и записывают показания максимальных термометров. Тест-объекты помещают в пробирки с 5 мл картофельно-глицеринового бульона.

Инкубирование посевов с тест-объектами проводят при температуре 37±1°С в течение 5-7 суток. Отсутствие помутнения питательной среды указывает на гибель микобактерий в тест-объектах. При наличии роста проводят сравнение выделенной культуры с тест-микобактерией.

В качестве контроля используют тест-объекты, которые не помещали в камеру, и питательную среду, которую применяли для культивирования тест-микроорганизма после обработки. Контрольные тест-объекты и среду проверяют аналогично тест-объектам, которые

обрабатывали в камере. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Эффективность обеззараживания вещей в дезинфекционных камерах должна быть равна 100% гибели Mycobacterium B5 на использованных тест-объектах.

1.2.3.7. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС при обеззараживании рук в резиновых перчатках

В качестве тест-микроорганизма используют суспензию M. terrae, содержащую (1,0-5,0)·10^8 КОЕ/мл, которую разводят до содержания 10^7, 10^5 и 10^3 КОЕ/мл.

Для устранения посторонней микрофлоры руки, включая запястья и предплечья, испытатели тщательно моют с мылом в теплой проточной воде, затем протирают стерильной марлевой салфеткой и надевают резиновые перчатки.

Поверхность резиновых перчаток, надетых на руки испытателей-добровольцев, контаминируют путем тщательного растирания 1 мл суспензии тремя вышеуказанными разведениями (каждое разведение на одного испытателя). После подсыхания микробной взвеси для контроля исходной обсемененности с поверхности резиновой перчатки тыльной стороны кисти делают смыв стерильной марлевой салфеткой размером 5×5 см, смоченной стерильной питьевой водой. Затем салфетку помещают в пробирку с 10 мл стерильной питьевой воды с бусами и встряхивают 10 мин. Полученный смыв высевают по 0,5 мл на скошенную поверхность питательной среды в пробирке.

Для обеззараживания поверхности перчаток в сжатую ладонь руки в перчатке испытателю-добровольцу наносят 2,5 мл исследуемого ДС. Затем он в течение 10-15 с протирает этой порцией дезинфицирующего

раствора поверхность перчаток обеих рук, совершая движения рук, которые выполняют при обработке кожи рук антисептиком. После этого такую же операцию проводят, нанося 2,5 мл дезинфицирующего раствора на ладонь второй руки, и засекают по секундомеру начало экспозиции.

Через 5 мин. (экспозиция) делают смыв марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной соответствующим нейтрализатором, предварительно проверенным на эффективность нейтрализации и статического действия. Салфетку помещают в пробирку с 10 мл стерильного нейтрализатора на 10 мин. Затем салфетку переносят стерильным пинцетом в пробирку с 10 мл стерильной питьевой воды с бусами, встряхивают пробирку 10 мин. в шейкере. Из полученного смыва делают посев по 0,5 мл на твердые питательные среды в пробирках (не менее 3 пробирок на пробу).

Эффективными считают режим применения ДС, обеспечивающий 100% гибель тест-микроорганизма на резиновых перчатках, защищающих кожу рук.

1.2.3.8. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, кал, мокрота) и крови

Обеззараживание мочи.

Мочу разливают в колбы или пробирки по 8 мл, добавляют 1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл M. terrae, и 1 мл инактивированной лошадиной сыворотки.

Растворы испытываемого ДС готовят в концентрациях, обеспечивающих туберкулоцидный эффект при испытании его на батистовых тест-объектах с белковой защитой.

Испытуемые растворы ДС добавляют к моче в равном или двойном объеме. Отмечают время контакта и через интервалы 15, 30, 60 мин. смесь в количестве 1 мл пипеткой переносят в пробирки с 5 мл соответствующего нейтрализатора. После тщательного смешивания 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку с 5 мл нейтрализатора и затем засевают по 0,1 мл в пробирки на скошенную поверхность питательной среды, как из первой, так и из второй пробирки. Посевы инкубируют в термостате при 37±1°С.

Контролем служат аналогично поставленные опыты только с добавлением к моче не дезинфицирующего раствора, а воды.

Ориентировочный учет результатов проводят через 10-14 суток, окончательный – 21 сутки. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100%. Окончательное заключение об эффективности ДС делают на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами.

Эффективным считают средство и режим его применения, обеспечивающие 100% гибель тест-микроорганизмов.

Обеззараживание кала. При разработке режимов обеззараживания кала учитывают соотношение ДС к обеззараживаемой массе, время обработки, температуру, консистенцию обеззараживаемых выделений, степень гомогенизации в процессе обеззараживания.

Исследования проводят в два этапа. На первом этапе в качестве тест-объекта используют 20% эмульсию фекалий, на втором – оформленные фекалии.

Для приготовления 20% эмульсии 20 г кала растирают в ступке и добавляют 80 мл воды; полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, стерилизуют в автоклаве, разливают пипеткой в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл суспензии

M. terrae. Опыты начинают ставить с концентрации, вызывающей гибель тест-микроорганизма в моче с белком через 30 мин. Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным объемом дезинфицирующего раствора и дальше производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через 21 сутки.

При положительных результатах проводят опыты с большим количеством оформленных фекалий (200-250 г). Для этого помещают их в сосуд, заливают дезинфицирующим раствором или засыпают сухими ДС в равном или двойном количестве по отношению к весу фекалий, определяют происходит ли гомогенизация фекалий. Затем небольшую часть каловых масс размешивают стеклянной палочкой с жидкостью, а остальную массу оставляют в виде небольших комочков. Через определенные промежутки времени (например, 30, 60 мин.) проводят посев.

Посев жидкой части фекалий производят так же, как в опытах с мочой. Плотные же части (комочки) забирают бактериологической петлей и помещают в 5 мл соответствующего нейтрализатора, растерев их о края пробирки и тщательно перемешав. Затем стерильной пипеткой переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, тоже содержащую нейтрализатор. Как из первой, так и из второй пробирки производят посев по 0,1 мл на скошенную поверхность питательной среды в пробирках (не менее чем в три пробирки). Предварительный результат учитывают через 10-14 суток, а окончательный – через 21 сутки.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением вместо дезинфицирующего раствора воды. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают

за 100%. Судят об эффективности исследуемого средства на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами. Эффективным считают средство и режим его применения, обеспечивающий 100% гибель тест-микроорганизмов в обеззараживаемом материале.

Обеззараживание крови и мокроты.

В качестве тест-объектов при оценке туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания крови, используют кровь, а мокроты – куриный белок. Для контаминации тест-объектов тест-микроорганизмом к 9 мл 40 % крови или 50 % куриного белка добавляют по 1 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, перемешивают и разливают по 1 мл в стерильные флаконы. Затем во флаконы засыпают или наливают исследуемое ДС в объемных (5%, 10% и т.д.) соотношениях к исследуемому материалу. Через определенные промежутки времени (1 час, 2 часа и т.д.) с помощью стерильной бактериологической петли производят отбор пробы смеси и переносят ее в 5 мл нейтрализатора для нейтрализации остаточного действия ДС на тест-микроорганизм. По истечении 5 мин. из этой пробирки с помощью пипетки производят высев по 0,2 мл исследуемой пробы на скошенную поверхность питательной среды в пробирках. Пробирки с посевами инкубируют при 37±1°С.

Предварительный результат роста тест-микроорганизмов на чашках учитывают через 10-14 суток, а окончательный – через 21 сутки.

Эффективным считают средство, обеспечивающее 100% гибель тест-микроорганизма в обеззараживаемом материале.

1.2.3.9. Исследование туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов

При изучении туберкулоцидной активности ДС с целью разработки режимов обеззараживания медицинских отходов используют тест-объекты из резин, пластмасс, текстильных материалов, стекла, металлов. Для приготовления тест-объектов стерильные одноразовые изделия медицинского назначения (бинты, ватные тампоны, фрагменты систем для переливания крови и лекарственных препаратов, катетеры, шпатели, шприцы, иглы перчатки, одноразовое белье, салфетки, пипетки, трубки и пр.) измельчают и погружают в суспензию тест-микроорганизма, содержащую $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл с добавлением 80% инактивированной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. После достаточного пропитывания объекты извлекают в сухую стерильную емкость и подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 20 мин. или при комнатной температуре 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60% Т в течение 1 ч.

Контаминированные тест-объекты погружают в емкость с испытуемым дезинфицирующим раствором так, чтобы он полностью закрывал их. Контроль эффективности обеззараживания объектов проводят через каждые 15-30 мин. в течение времени до 360 мин. Для этого тесты из различных материалов (по два каждого наименования) извлекают из дезинфицирующего раствора, промывают в растворе соответствующего нейтрализатора, из полученных смывов производят посев по 0,1 мл на поверхность твердой питательной среды. Контрольные тест-объекты погружают в стерильную водопроводную воду на срок максимальной экспозиции, а затем высевают на скошенную поверхность питательной среды. Пробирки с посевами

помещают в термостат при температуре 37±1°С. Окончательный учет результатов проводят на 21 сутки.

Критерий эффективности обеззараживания медицинских отходов – 100% гибель M. terrae на тест-объектах, обработанных ДС.

1.2.3.10. Методы определения туберкулоцидной активности ДС при обеззараживании воздуха

Химические ДС применяют для обеззараживания воздуха в помещениях в виде аэрозолей или паров растворов ДС, а также газов.

При исследовании эффективности обеззараживания воздуха химическими ДС с целью разработки режима его применения при туберкулезе в качестве тест-микроорганизмов используют M.terrae.

Исследования проводят в испытательных камерах объемом 1 или 2 $м^3$. Предварительно внутреннюю поверхность камеры моют раствором моющего средства, остатки которого затем смывают водопроводной водой и включают бактерицидный УФ-облучатель. В центре камеры располагают продезинфицированный вентилятор, производительностью 15-25 $м^3$/час, назначение которого – предотвращение быстрого оседания микроорганизмов.

Для определения эффективности обеззараживания воздуха используют аспирационный метод.

В камере распыляют суспензию тест-микроорганизма в количестве, достаточном для создания в воздухе камеры концентрации микроорганизмов $2,1x10^4$ КОЕ/$м^3$ (определяется опытным путем).

Аэрозоль дезинфицирующего средства создают с помощью распыливающей аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80% частиц с дисперсностью 10-15 мкм, и включают вентилятор. Затем в камере распыляют раствор исследуемого средства и

через определенные промежутки времени проверяют обсемененность воздуха.

Аспирационный метод основан на аспирации воздуха через жидкость. При использовании аспирационного метода для оценки эффективности обеззараживания воздуха необходимо следующее оборудование:

– воздуходувка с производительностью 15-25 л/мин;

– стерильные склянки Дрекселя с 50 мл стерильной водопроводной воды из расчета 2 шт. на 1 пробу. Предварительно в стерильную воду вносят нейтрализатор, соответствующий испытуемому ДС;

– трубка диаметром 8-10 мм, длиной 50-60 см, которая вводится в камеру для забора проб воздуха в центре камеры;

– стерильные резиновые шланги, соединяющие склянки Дрекселя (последовательно одну за другой) и далее с воздуходувкой.

Подготовка камеры к эксперименту осуществляется, как указано выше. На исследование отбирается 50 л воздуха (объем пробы).

Последовательность отбора проб следующая:

1 – проведение контроля обсемененности воздуха до начала распыления суспензии тест-микроорганизмов;

2 – проведение контроля обсемененности воздуха после распыления суспензии тест-культуры;

3 – проведение контроля эффективности обеззараживания воздуха - отбор проб через каждые 5-10 мин. в зависимости от предполагаемой эффективности ДС.

После отбора проб жидкость из 2-х склянок Дрекселя смешивают и по 1 мл вносят в пробирки со скошенной питательной средой. Посевы помещают в термостат. Предварительный учет результатов проводят

через 10-14 суток, окончательный – через 21 сутки. Критерий эффективности обеззараживания воздуха – 100%.

1.2.4. Методы исследования и оценки туберкулоцидной активности ДС в практических условиях

Практические испытания проводят в тех случаях, когда ДС содержит новое действующее вещество и требуется подтверждение эффективности разработанных в лабораторных условиях режимов в отношении возбудителей туберкулеза и микобактериозов.

Испытания проводят в соответствии с Инструкцией по испытанию ДС, оценивая туберкулоцидную эффективность, безопасность применения и надежность рекомендованных мер предосторожности, физико-химические качества ДС: растворимость, запах, наличие моющего действия и пр.

При оценке эффективности ДС предварительно оценивают обсемененность объектов окружающей среды, имеющих эпидемиологическое значение при туберкулезе, до проведения дезинфекции (фон) и сравнивают ее с обсемененностью этих объектов после обработки рабочим раствором ДС.

Эффективным считают средство, после обработки которым в соответствии с режимом, указанным в Инструкции, на объектах не обнаруживают возбудителей туберкулеза, микобактериозов и S.aureus.

По завершении испытаний оформляется акт испытаний, в котором отражаются указанные выше параметры и другие отмеченные свойства.

1.2.5. Приложения

Приложение 1 (справочное)

Характеристика тест-микобактерий по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам.

Mycobacterium B5 представляют собой полиморфные, неподвижные, неспорообразующие палочки, размером 0,2-0,6х1-10 мкм (как и другие виды микобактерий).

Mycobacterium B5 – грамположительные, аэробы, растут на элективных питательных средах на яичной основе (реакция среды почти нейтральная (pH 6,8-7,2)): Петраньяни, Левенштейна-Йенсена, «Новая» и др. при оптимальной температуре 37ºС, хотя могут расти при температуре 25-38ºС. Колонии Mycobacterium B5 на плотных питательных средах представляют собой шероховатые, матовые, выпуклые образования ярко оранжево-желтого цвета. Оранжево-желтая окраска колоний обусловлена пигментом, который образуется при культивировании Mycobacterium B5 в темноте. Длительность роста Mycobacterium B5 на питательных средах составляет от 5-х до 7-ти суток. На элективных синтетических питательных средах (например, Миддлбрука 7H9 с 10% ростовой добавки ADC, 7H10 с 10% ростовой добавки OADC) Mycobacterium B5 растет плохо или вообще не растет.

В мазках из молодых культур Mycobacterium B5 имеют вид коротких, толстых палочек, расположенных поодиночке. В старых культурах имеют овоидную, колбовидную или веретенообразную форму. Окрашиваются по Циль-Нильсену в малиново-красный цвет.

Mycobacterium B5 проявляют более выраженную каталазную активность, чем вирулентные виды микобактерий, и в большей степени, чем последние, разлагают перекись водорода. Пероксидаза

Mycobacterium B5 более устойчива к температурным воздействиям, чем таковая вирулентных микобактерий. Mycobacterium B5 не свертывают молоко, не разжижают желатины.

По классификации патогенных для человека микроорганизмов Mycobacterium B5, как и все микобактерии, относятся к IV группе опасности, являются непатогенными микроорганизмами.

Mycobacterium B5 используют для оценки эффективности камерного обеззараживания вещей, одежды и других объектов как наиболее адекватную модель возбудителя туберкулеза к температурному воздействию.

Тест-микроорганизм Mycobacterium B5 хранится в музее ФГУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

Mycobacterium terrae (ATCC 15755, DSM 43227) представляют собой короткие прямые палочки малиново-красного цвета, располагающиеся в мазке параллельно друг другу, наподобие частокола. Микобактерии M. terrae неподвижные, грамположительные, не образующие спор и капсул. В связи с высоким содержанием миколовых кислот плохо окрашиваются обычными методами, но хорошо окрашиваются по Циль-Нильсену в малиново-красный цвет.

Микобактерии M. terrae – аэробы, температурные границы роста – от 25°C до 37°C, оптимальная температура – 37ºC.

M. terrae требовательны к питательным средам, растут на элективных средах (реакция среды почти нейтральная (pH 6,4-7,0): Левенштейна-Йенсена, «Новая», Миддлбрука 7H9 с 10% ростовой добавки ADC, 7H10 с 10% ростовой добавки OADC и др. Колонии M. terrae на среде Левенштейна-Йенсена – шероховатые и матовые выпуклые округлые образования, на среде «Новая» – гладкие и

блестящие или с молочным или желтоватым оттенком. Длительность роста M. terrae на питательных средах зависит от состава среды. При оптимальной температуре икубирования на «богатых» питательных средах Левенштейна-Йенсена и «Новая» рост M. terrae может появиться на 5-7 сутки. На «голодных» питательных средах инкубация M. terrae составляет до 8 недель.

M. terrae гидролизуют Твин 80 (т.к. продуцируют липазы), имеют высокоактивную каталазу и проявляют β-галактазную активность. Восстанавливают теллурит калия до металлического теллура в течение 9 дней.

По классификации патогенных для человека микроорганизмов относится к IV группе опасности, является непатогенным микроорганизмом.

Приложение 2 (рекомендуемое)

Методики приготовления питательных сред для культивирования тест-микобактерий, предназначенных для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций.

Методика приготовления среды Петраньяни

В рецептуру питательной среды входят следующие компоненты:

пептон – 2 г;

крахмал – 12 г;

молоко – 300 мл;

яйца – 10 шт.;

картофель – 2 шт.;

малахитовый зеленый – 2 г;

глицерин – 24 мл;

вода – 100 мл.

В стерильную колбу (1 л) помещают 12 г крахмала и 2 г пептона. Затем добавляют 2 шт. мелко нарезанного картофеля (картофель предварительно моют с мылом и щеткой, чистят). Доливают в колбу 300 мл свежего цельного молока и подогревают на водяной бане в течение часа (с момента начала свертывания молока) при постоянном помешивании. В другую стерильную колбу разбивают 8 диетических яиц и 2 желтка. Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, затем оставляют на 30 мин. в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70% этиловый спирт на 30 мин. Перед тем, как начать работу с чистыми и сухими яйцами, рекомендуется тщательно вымыть руки с мылом и щеткой. Яйца тщательно взбивают до однородной массы и переливают в колбу со смесью крахмала, пептона, картофеля и молока. Сюда же добавляют 24 мл глицерина и 16 мл 2% раствора малахитовой зелени. Полученную смесь тщательно перемешивают, фильтруют через стерильную марлевый фильтр в стерильную колбу. Для свертывания среды используют специальные аппараты-свертыватели типа «АСПС». Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования скошенной поверхности среды высотой 8-10 см. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 85°С в течение 45 мин.

Приготовление раствора малахитового зеленого:

Малахитовый зеленый – 2 г;

Стерильная дистиллированная вода – 100 мл.

Взвешенный порошок малахитового зеленого растворяют в стерильной теплой дистиллированной воде и помещают раствор в

термостат на 1-2-2,5 часа для большего растворения. Затем фильтруют раствор через бумажный фильтр, разливают по флаконам или небольшим колбам и стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121°С) в течение 30 мин. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, и при появлении осадка или изменении окраски его заменяют свежим раствором.

Методика приготовления картофельно-глицеринового бульона.

Готовят картофельный отвар. На 1 л питьевой воды берут 200г очищенного (картофель предварительно моют с мылом и щеткой, чистят) картофеля, отваривают в течение 30 мин с момента закипания, остужают и отстаивают. Затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доводят водой до первоначального объема, добавляют 10 мл глицерина. pH картофельного бульона 7,0-7,2. Бульон стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (1210С) в течение 30 минут.

Методика приготовления картофельно-глицеринового агара

В рецептуру питательной среды входят следующие компоненты:

Картофельно-глицериновый бульон;

Пептон – 5 г;

Мел – 1 г;

Агар-агар – 20 г;

Вода – 1 л.

К картофельно-глицериновому бульону добавляют 5 г пептона, 20 г агар-агара, 1 г мела, устанавливают pH 7,0-7,2. Агар расплавляют и разливают в пробирки или колбы. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121°С) в течение 30 мин.

Методика приготовления среды Миддлбрука 7H9 (бульон) с 10% ADC ростовой добавкой (MADC-бульон для хранения замороженных культур при минус 70ºС)

Миддлбрук 7H9 порошок бульона – 4,7 г;

Глицерин (C3H8O3) – 100,0 мл;

Вода (стерильная, дистиллированная) – 750,0 мл.

Ингредиенты соединить, перемешать, стерилизовать в паровом стерилизаторе при 1,1 атм. (121°С) в течение 10 мин., охладить до 45ºС. Добавить в асептических условиях 100 мл ростовой добавки ADC и стерильной дистиллированной воды до 1000,0 мл.

pH среды будет эквивалентен 6,6±0,2 в бульоне, остывшем до 25ºС.

Методика приготовления среды Левенштейна-Йенсена

Среда Левенштейна-Йенсена – международная среда, широко используемая в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности.

Это плотная яичная среда, на которой видимый рост M. terrae получают приблизительно на 7-10 день после посева. Для чистоты эксперимента желательно использовать готовую питательную среду в стандартных пробирках с завинчивающимися крышками. При невозможности приобретения готовой среды, ее можно приготовить самостоятельно.

В состав среды Левенштейна-Йенсена входят следующие компоненты:

Раствор минеральных солей:

Калий однозамещенный фосфорнокислый – 2,4 г;

Магний лимоннокислый – 0,6 г;

Магний сернокислый – 0,24 г;

L- аспарагин – 3,6 г;

Глицерин – 12,0 мл;

Вода дистиллированная – 600 мл.

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в теплой дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. L-аспарагин рекомендуется растворять отдельно и вносить последним. Затем солевой раствор стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121°С) в течение 20-30 мин. Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

Раствор малахитового зеленого:

Малахитовый зеленый – 2 г;

Стерильная дистиллированная вода – 100 мл.

Взвешенный порошок малахитового зеленого растворяют в стерильной теплой дистиллированной воде и помещают раствор в термостат на 1-2-2,5 часа для большего растворения. Затем фильтруют раствор через бумажный фильтр, разливают по флаконам или небольшим колбам и стерилизуют при 1 атм. (121°С) в течение 30 мин. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, и при появлении осадка или изменении окраски его заменяют свежим раствором.

Яичная масса.

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, затем оставляют на 30 мин. в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70% этиловый спирт на 30 мин. Перед

тем, как начать работу с чистыми и сухими яйцами, рекомендуется тщательно вымыть руки с мылом и щеткой. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20-25 яиц, в зависимости от их величины). Тщательно взбивают яичную массу стерильным венчиком или в стерильном миксере при минимальной скорости.

Приготовление среды.

В большую стерильную емкость, соблюдая правила асептики, помещают следующие растворы:

Раствор минеральных солей – 600 мл;

Гомогенизированная яичная масса – 1000 мл.

Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через 4-х слойный стерильный марлевый фильтр. Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и в течение не более 15 мин. разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не сформировался осадок.

Коагуляция (свертывание) среды.

Для свертывания среды используют специальные аппараты-свертыватели типа «АСПС». Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования скошенной поверхности среды высотой 8–10 см. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 85°С в течение 45 мин.

Хранение среды.

Готовую питательную среду проверяют на стерильность, помещая 10 пробирок из вновь приготовленной партии в термостат при 37°С на 3 суток. По истечении времени инкубации в пробирках на

питательной среде должен отсутствовать микробный рост. В случае наличия роста приготовленная партия среды подлежит уничтожению. Приготовленная партия среды должна иметь этикетку с датой изготовления и сохраняться в холодильнике при 4°С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели.

Методика приготовления среды «Новая»

Среда «Новая» – это плотная яичная среда, на которой хороший рост колоний M. terrae получают приблизительно на 5-7 день после посева материала (проб).

В рецептуру питательной среды «Новая» входят следующие компоненты (в весовых %):

Калий фосфорнокислый одноосновной	0,05
Натрий лимоннокислый	0,05
Магний сернокислый	0,05
Натрий пировиноградноκислый (гликокол)	0,2
Глицерин	3,6
Малахитовая зелень	0,036
Желтки яиц	50,0
Дистиллированная вода	до 100,0

Способ получения концентрированной питательной среды заключается в смешивании сухих навесок ингредиентов солей (кроме бактерицидного красителя) с желточной массой, стерилизации ингредиентов 70% этиловым спиртом, растворении бактерицидного красителя в глицерине и соединении всех компонентов среды.

Для получения 1 литра концентрированной питательной среды необходимо:

сделать навески: однозамещенного фосфорно-кислого калия – 1 г, лимоннокислого натрия – 1 г, сернокислого магния – 1 г, натрия

пировиноградноkислого (гликокола) – 4 г, и каждую навеску поместить в стерильную фарфоровую ступку;

обеззаразить навески путем смачивания каждой навески 1 мл 70% этилового спирта, затем поместить ступки с навесками в термостат при температуре 37°С и высушить при периодическом помешивании в течение 45 мин.;

приготовить 1 л желточной массы: 50 штук куриных яиц обработать снаружи с целью обеззараживания 70% спиртом, затем отделить белок от желтка, перенести желточную массу в мерную колбу и тщательно гомогенизировать.

Далее приготовить желточно-солевую смесь: к 1 л желточной массы добавить обеззараженные навески и перемешать.

Приготовить раствор бактерицидного красителя: навеску 700 мг малахитовой зелени смочить 1 мл 70% спирта и соединить с 70 мл глицерина (это соответствует 1% раствору малахитового зеленого в глицерине).

Получение концентрированной питательной смеси.

Производят соединение 1 л желточно-солевой смеси с 70 мл 1% раствора малахитового зеленого в глицерине и тщательно гомогенизируют. Полученную концентрированную питательную смесь (среду) выдерживают в течение суток при комнатной температуре и разливают среду во флаконы емкостью 250 мл, которые герметично упаковывают и маркируют. Укупоренные флаконы с концентрированной питательной средой хранят в холодильнике при 3-5°С в течение 3-4 недель.

Приготовление рабочей (используемой при тестировании ДС) плотной питательной среды в пробирках.

К концентрированной питательной среде добавляют равный объем стерильной дистиллированной воды (1:1), гомогенизируют, разливают по 5 мл в пробирки. Для образования скоса питательной среды пробирки укладывают в наклонном положении в свертыватель, предварительно нагретый до 90°С. Среду коагулируют 20 мин. при температуре 82-83°С. Контроль приготовленной партии среды на стерильность осуществляют также, как описано для среды Левенштейна-Йенсена.

Пробирки с питательной средой могут храниться в холодильнике при температуре 5°С в течение 4 недель. При длительном хранении необходимо пробирки герметично укупорить и поместить в полиэтиленовые пакеты, чтобы предотвратить высыхание среды.

Приложение 3 (рекомендуемое)

Материалы и оборудование, необходимые для изучения туберкулоцидной активности ДС

Химические вещества:

магний сернокислый $MgSO_4$ х $7H_2O$ – ГОСТ 4523-77;

натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_3$ х $5,5H_2O$ – ГОСТ 22280-86;

калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 – ТУ-6-09-5324-87;

натрий пировиноградноκислый – ТУ 6-09-08-990-83;

глицерин $C_3H_8O_3$ – ГОСТ 6259-75;

малахитовый зеленый $C_{52}H_{54}O_{12}N_4$ – ТУ-6-09-1557-77;

вода дистиллированная – ГОСТ 6709-77;

желтки куриных яиц;

магний лимоннокислый $Mg_3(C_6H_5O_7)_2$х$14H_2O$ – ТУ-6-09-1770-77;

L-аспарагин $C_4H_8N_2O_3$ х H_2O – импортный реактив;

Миддлбрук 7H9 порошок бульона – импортная среда;

10% ADC ростовая добавка – импортный реактив;

нейтрализующий бульон Ди-Ингли – фирма HIMEDIA;

спирт этиловый, ректификационный технический – ГОСТ 18300-72;

стерильная дистиллированная вода.

Оборудование:

весы лабораторные (например, весы для химических реактивов с точностью до 0,01 г, ГОСТ 24104-80, рекомендованные к применению приказом МЗ РФ №109);

аппарат для свертывания питательных сред (например, АСПС-«Торгмаш», рег. № 29/07020401/3573-02);

термостат на 37°С (например, термостат суховоздушный ТВ-80-«ПК-К», рег. №98/219-151);

низкотемпературная морозильная камера для хранения тест-культур микроорганизмов (например, морозильник сверхнизких температур MDF-4086S, рег. № 60202380);

камера на 1 или 2 $м^3$ с необходимыми приспособлениями для изучения обеззараживания воздуха;

микроскоп;

аэрозольный генератор;

гидропульт, автомакс, «Квазар»;

шейкер (например, шейкер лабораторный S-3.02, рег. №14413 ГОСТ 12.2.05.);

бытовой холодильник (например, холодильник-морозильник STINOL 256Q сер.№ 103410881041);

плита электрическая бытовая, ГОСТ 14919-83;

штативы лабораторные химические, ТУ 48-0534-8-87;

тест-объекты: ткань бязевая и батистовая; поверхности размером 10х10 см из различных материалов; предметы ухода за больными; игрушки мелкие и крупные из различных материалов; медицинские инструменты разнообразные по форме, характеру поверхности и материалу; жесткий и гибкий эндоскопы; набор резиновых и пластиковых трубок; столовая посуда и приборы; лабораторная посуда и посуда из-под выделений; бинты, вата;

секундомер механический, ГОСТ 8.423-81;

термометры, ГОСТ 215-73;

карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904-78;

лабораторная посуда:

пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 $см^3$ 2-го класса точности, ГОСТ 20292-74;

пробирки химические, ГОСТ 10515-6;

чашки Петри, ГОСТ 25336-82;

спиртовка лабораторная, ГОСТ 25336-82 или газовая горелка;

цилиндры вместимостью 100,0 и 250,0 $см^3$, ГОСТ 1770-74;

колбы вместимостью 100,0; 250,0 и 1000,0 $см^3$ ГОСТ 25 336-82;

склянки Дрекселя.

1.3 Методы изучения и оценки фунгицидной активности дезинфицирующих средств

1.3.1 Общие положения

1.3.1.1 Тест-микроорганизмы для изучения фунгицидной активности ДС и их субстанций. Требования к тест-грибам

При изучении фунгицидной активности ДС и их субстанций в качестве тест-микроорганизмов используют культуры грибов:

Candida albicans (штамм 15), Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386) – для оценки фунгицидной активности в отношении возбудителей кандидозов,

Trichophyton gypseum (муз. штамм НИИД), Trichophyton mentagrophytes ATCC 3533 (ДСМ 4870) – для оценки фунгицидной активности в отношении возбудителей дерматофитий,

Aspergillus niger (муз. штамм НИИД), Aspergilla niger ATCC16404 (ДСМ 1988) – для оценки фунгицидной активности в отношении плесневых грибов рода Aspergillus.

При сертификационных испытаниях и экспертной оценке ранее зарегистрированных ДС набор тест-микроорганизмов может быть ограничен наиболее устойчивыми представителями каждой группы.

Условия культивирования тест-грибов.

Тест-микроорганизмы культивируют на следующих питательных средах:

C.albicans – на бульоне Сабуро, агаре Сабуро при температуре 27±1°С в течение 2-10 суток или при температуре 30±1°С в течение 2-5 суток;

T.gypseum – на бульоне Сабуро, агаре Сабуро при температуре 27±1°С в течение 28 суток;

A. niger – на бульоне Сабуро, агаре Сабуро при температуре 37°С в течение 2 суток, а затем выдерживают 3-5 суток при температуре 20±2°С в темном месте.

Музейные культуры указанных выше микроорганизмов хранят при температуре 3±1°С в ампулах (после лиофильной сушки) или на плотных питательных средах (посев уколом) под слоем стерильного вазелинового масла (толщина слоя 1,5-3 мм), а рабочие культуры – на скошенном агаре или в бульоне.

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные биохимические, морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, присущие данному виду и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС: растворам хлорамина, перекиси водорода, Катамина АБ – алкилдиметилбензиламмония хлорида (АДБАХ), глутарового альдегида (таблица 5.7.).

Таблица 5.7

Устойчивость тест-микроорганизмов к дезинфицирующим средствам

Дезинфицирующее средство	Концентрация раствора по ДВ, %	Время гибели тест-грибов, мин. не менее		
		C.albicans	T.gypseum	A.niger
Хлорамин	1,0*	35	50	-
АДБАХ	0,5	5	25	-
Глутаровый альдегид	1,0 2,0 2,5	15 - -	- 30 -	- - 60
Перекись водорода	4,0 6,0	- >60	50 -	- 60

Примечание – знак (*) обозначает, что концентрация раствора указана по препарату.

Методы приготовления суспензии тест-микроорганизмов. Определение биологической концентрации тест-грибов в суспензии.

Культуры тест-грибов подвергают контролю их качества. В частности, непосредственно перед использованием культур для исследовательских целей необходимо убедиться в том, что тест-штаммы, выросшие на питательной среде, не загрязнены посторонней микрофлорой. Для оценки роста культур тест-грибов визуально просматривают каждую пробирку и учитывают характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды.

Рабочие суспензии тест-грибов готовят из культуры данного тест-штамма, выращенного на питательной среде.

Культуру T.gypseum, выращенную на бульоне Сабуро при температуре 27±1°С в течение 28 суток, извлекают петлей из пробирки, помещают в фарфоровую ступку и растирают с небольшим количеством стерильного физиологического раствора до гомогенной взвеси с минимальным размером частиц. Полученную суспензию фильтруют через стерильный ватно-марлевый фильтр и доводят с помощью физиологического раствора по оптическому стандарту мутности (производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, стандарт мутности по МакФарланду) $2 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл. В случае отсутствия готового стандарта мутности контроль количества микробных тел проводят с помощью денситометра.

Культуру C.albicans выращивают на агаре Сабуро в течение 2 суток при температуре 27±1°С. Затем ее смывают с питательной среды небольшим количеством стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Полученную суспензию фильтруют и разводят так же, как и культуру T.gypseum.

Культуру A.niger, выращенную на бульоне Сабуро в течение 2 суток и выдержанную в течение 3-5 суток в темном месте, извлекают петлей из пробирки, помещают в фарфоровую ступку и растирают с небольшим количеством стерильного физиологического раствора до гомогенной суспензии с минимальным размером частиц. Полученную взвесь фильтруют через стерильный ватно-марлевый фильтр и доводят до концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл по оптическому стандарту мутности (производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, стандарт мутности по МакФарланду) $2 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл. В случае отсутствия готового стандарта мутности контроль количества микробных тел проводят с помощью денситометра.

В связи с тем, что суспензия может содержать наряду с живыми мертвые микроорганизмы, необходимо определять биологическую концентрацию тест-грибов. Для этого проводят десятикратные разведения суспензии тест-гриба в стерильной питьевой воде с последующим высевом суспензии в чашки Петри с плотной питательной средой (агар Сабуро). После определенного времени инкубации при соответствующей температуре подсчитывают количество выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяют количество жизнеспособных клеток в одном мл суспензии.

Устойчивость тест-грибов к растворам эталонных ДС определяют методом батистовых тест-объектов (п. 1.3.2.2). Проверку устойчивости проводят не реже 1 раза в месяц. При снижении резистентности культур делают их пересевы на обогащенные питательные среды до восстановления устойчивости.

Приготовление рабочих растворов ДС и их субстанций проводят в соответствии с п.1.1.1.2.

1.3.2 Методы исследований и оценки результатов фунгицидной активности ДС и их субстанций in vitro

Целью исследований является определение уровня и спектра фунгицидной активности ДС и их субстанций.

Субстанции (действующие вещества), предназначенные для производства ДС должны соответствовать следующим требованиям:

хорошо растворяться в воде или других растворителях;

обладать фунгицидным действием, то есть убивать грибы, а не задерживать их рост;

иметь удовлетворительные органолептические (по цвету, запаху) и физико-химические (по растворимости, биоразлагаемости и стабильности при хранении и др.) свойства.

Фунгицидную активность ДС и их субстанций определяют суспензионным методом или методом батистовых тест-объектов.

1.3.2.1 Суспензионный метод

Для приготовления растворов ДС в различных концентрациях ДВ средства разводят или растворяют в стерильной питьевой воде и по 4,5 мл разливают в стерильные пробирки. Добавляют по 0,5 мл суспензии тест-гриба (см. п.1.3.1.1.), содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, и тщательно перемешивают. Через определенные интервалы времени (15 мин.) по 0,5 мл взвеси «тест-микроорганизм +ДВ» добавляют к 4,5 мл соответствующего нейтрализатора. Тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем по 0,5 мл вносят в пробирку с 4,5 мл стерильной питьевой воды, после чего 0,1 мл из этой пробы вносят в пробирки с 5 мл жидкой и на поверхность твердой питательной среды. В контрольных опытах вместо ДВ используют стерильную питьевую воду, а посевы делают в среду без нейтрализатора и с нейтрализатором.

Температура инкубирования посевов в термостате и сроки учета результатов опыта зависят от вида микроорганизма (п.1.3.1.1). Для подтверждения снятия биоцидного действия ДВ из пробирок, в которых отсутствовал рост тест-грибов, ежедневно делают пересев по 0,5 мл в 4,5 мл новой питательной среды.

Результаты опыта оценивают по наличию или отсутствию роста грибов в жидкой и на твердой питательной среде. Сравнение проводят с контролем опыта, которым является посев тест-грибов в питательную среду без добавления действующего вещества.

Эффективной считают концентрацию средства, при которой трижды повторенный опыт при определенном времени воздействия дает отрицательный результат (отсутствие роста грибов) при наличии типичного роста тест-гриба в контроле.

1.3.2.2 Метод батистовых тест-объектов

Приготовление суспензии грибов проводят в соответствии с п. 1.3.1.1. Подготовку батистовых тест-объектов, их контаминацию и постановку эксперимента осуществляют так, как указано в п. 1.1.2.2.

Хранят контаминированные тест-объекты в чашках Петри в холодильнике при температуре плюс 4°С.

Срок хранения тест-объектов, контаминированных C.albicans – 4 суток, T.gypseum и A.niger – 30 суток.

Критерием активности ДВ (субстанции) является 100% гибель тест-грибов (отсутствие роста в опытных пробах) при времени дезинфекционной выдержки: C.albicans, T.gypseum, A.niger – не более 60 мин.

1.3.2.3 Методы исключения фунгистатического действия действующих веществ

Для определения фунгицидного и исключения фунгистатического действия ДВ по истечении экспозиции необходимо прекратить воздействие ДВ на тест-культуру. Это достигается путем использования следующих методов:

применения химического нейтрализатора;

посева в большой объем питательной среды;

ежедневного пересева на новые питательные среды.

Применение химического нейтрализатора ДВ, контроль его эффективности и полноты нейтрализации ДВ при воздействии на культуры грибов проводят в соответствии с п. 1.1.2.3.

Критерии отбора действующих веществ (субстанций). Критерием отбора действующего вещества в качестве субстанции для создания ДС, предназначенных для обеззараживания объектов, контаминированных тест-грибами, является наличие у него фунгицидной активности.

Гибель тест-микроорганизмов должна составлять 100% при времени действия (мин.) ДС в минимальной концентрации в отношении:

грибов C.albicans, T.gypseum – не более 60 мин.;

A.niger – не более 120 мин.

1.3.2.4 Методы изучения факторов, влияющих на фунгицидную активность ДС и их субстанций

Исследования включают определение спектра фунгицидного действия ДС, а при проведении углубленного изучения дополнительно определяют влияние различных факторов (pH, температура, органические вещества) на фунгицидную активность растворов ДС.

Изучение спектра фунгицидной активности и влияние на активность различных факторов проводят методом батистовых тест-объектов, контаминированных тест-культурами C.albicans, T.gypseum, A.niger.

Изучение зависимости активности ДС от присутствия органических веществ и pH, а также изучение влияния температуры на активность исследуемого ДС проводят в соответствии с п. 1.1.2.4.

Критерии оценки фунгицидной активности ДС.

Для ДС, предназначенных для обеззараживания различных объектов, гибель тест-грибов должна составлять 100% при времени действия (мин) дезинфицирующего раствора в минимальной концентрации ДВ в отношении:

грибов C.albicans, T.gypseum – не более 60 мин;

A.niger – не более 120 мин.

Влияние факторов среды на активность ДС учитывается при разработке оптимальных режимов и применении ДС в практике.

1.3.3. Методы исследования фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания различных объектов внешней среды, контаминированных тест-грибами

Цель исследования – разработка режимов применения ДС с учетом условий их дальнейшего применения в практике для обеззараживании ИМН, предметов ухода за больными, игрушек, белья, поверхностей, посуды, выделений и пр., в зависимости от вида контаминации, концентрации действующего вещества, времени воздействия, нормы расхода, характера объекта, наличия на нем органического загрязнения и его специфики, температуры, способа и кратности обработки.

1.3.3.1 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий

При выборе ДС для изучения с целью последующей рекомендации для обеззараживания медицинских изделий следует учитывать:

назначение и кратность применения изделия (многократного или однократного применения);

наличие у средства негативных свойств, например, коррозирующего или фиксирующего действия и др., ограничивающих возможности его использования или требующих индивидуального методического подхода при исследовании;

материал (материалы) из которого изготовлено изделие;

функциональные особенности изделия и условия его эксплуатации, обуславливающие особенности методики проведения эксперимента и последующих рекомендаций по технологии их обеззараживания.

Определение эффективности ДС
при обработке медицинских изделий из различных материалов
(кроме эндоскопов).

В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и изделия медицинского назначения (катетеры, микропипетки, пластмассовые шпатели и др.) из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их тест-объекты. Перечень инструментов, взятых в эксперимент, должен включать не менее трех инструментов, имеющих замковые части (щипцы, ножницы, корнцанг) и не менее двух, не имеющих замковых частей (пинцеты, шпатели), а также стоматологические, в том числе вращающиеся, инструменты (не менее 4) – бор, бурав корневой, зеркало, диск шлифовальный.

В качестве тест-изделий из резин, стекла, пластмасс используют фрагменты изделий (катетеров, микропипеток, шпателей и пр.).

В качестве тест-грибов используют суспензии культур C. albicans, T.gypseum. На поверхность тест-изделия (у замковых изделий – в область замка, а при наличии каналов и полостей – также в канал изделия) с помощью пипетки наносят по 0,1 мл 1 млрд суспензии того или иного вида тест-микроорганизмов, содержащей 40% инактивированной лошадиной сыворотки. Тест-изделия подсушивают до полного высыхания. Мелкие тест-изделия погружают в указанную суспензию грибов на 15 мин., затем их извлекают и подсушивают (до полного высыхания). Дезинфицирующие растворы готовят на стерильной питьевой 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 воду.

Через определенное время (от 5 до 120 мин.) изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой размером 5х5 $см^2$, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, затем салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора и встряхивают с бусами в течение 5-10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора. Мелкие изделия погружают в раствор нейтрализатора на 5 мин., а затем переносят в пробирки с жидкой

питательной средой. Для контроля эффективности обеззараживания смывную жидкость с поверхности изделия и из канала засевают на соответствующие питательные среды (п. 1.3.1.1.). Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста использованного тест-микроорганизма.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-грибов на всех изделиях. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая концентрацию или время воздействия.

Критерий эффективности обеззараживания – 100% гибель C.albicans, T.gypseum.

Время обеззараживания изделий, контаминированных C.albicans, T.gypseum – не более 120 мин.

1.3.3.2 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов, включая дезинфекцию высокого уровня

Для определения эффективности ДС при обеззараживании эндоскопов в качестве тест-объектов используют стерильные фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий – гастроскоп, жесткий – цистоскоп), а в качестве тест-гриба - C. albicans.

На наружную поверхность тест-объекта наносят по 0,1 мл 1 млрд. суспензии C. albicans, содержащей 5% сыворотки; через канал эндоскопа с помощью пипетки пропускают не менее 5 мл такой же суспензии. После этого эндоскоп подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя полости

и каналы эндоскопа. Через определенные интервалы времени в течение 5-60 мин. изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой, смоченной в растворе нейтрализатора. Канал изделия промывают нейтрализатором. Смывную жидкость засевают на соответствующие питательные среды.

Критерий эффективности обеззараживания эндоскопов – 100% гибель C.albicans не более чем через 60 мин.

Определение эффективности ДС при дезинфекции высокого уровня (ДВУ) эндоскопов. Данная методика предназначена для разработки режимов дезинфекции высокого уровня (ДВУ) эндоскопов при проведении «нестерильных» диагностических и лечебных манипуляций.

ДС, предназначенное для ДВУ эндоскопов должно обеспечивать гибель на эндоскопах C.albicans.

Для исследования выбирают ДС, эффективное для стерилизации эндоскопов, и испытания его проводят при тех же условиях (концентрация, температура), что и при стерилизации эндоскопов, определяя необходимое время дезинфекционной выдержки для достижения гибели тест-микроорганизма. При определении эффективности средств для ДВУ эндоскопов в качестве тест-объектов используют фрагменты канала гибкого эндоскопа или его имитаторы в виде трубок из пластика длиной 2 см, диаметром 2 мм.

Стерильные тест-объекты искусственно контаминируют, нанося с помощью дозатора/микропипетки в центральную часть канала и на поверхность каждой трубки суспензию C.albicans из расчета 106 клеток C.albicans на каждое изделие. Для имитации органического загрязнения к суспензии микроорганизмов перед контаминацией объекта добавляют 2% инактивированной лошадиной сыворотки.

Контаминированные тест-объекты подсушивают при комнатной температуре (плюс 18-22°С) в течение 20 мин.

Дезинфицирующий раствор готовят на стерильной питьевой воде согласно п. 1.2. Обработку исследуемым ДС осуществляют способом погружения в испытуемый дезинфицирующий раствор. Через определенные интервалы времени, зависящие от химического состава средства, в промежутке от 5 до 60 мин., тест-изделия извлекают из дезинфицирующего раствора, помещают на 5-10 мин. в раствор соответствующего нейтрализатора.

Затем тест-изделия помещают в пробирки с питательной средой для проверки эффективности обеззараживания: для C.albicans – бульон Сабуро.

Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста использованного тест-микроорганизма: для C.albicans – 27±1°С и 7 суток, после чего проводят учет результатов эксперимента.

В качестве контроля используют тест-объекты, контаминированные как указано выше и помещенные в воду на время дезинфекционной выдержки.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех тест-изделиях при отсутствии его роста в питательной среде. Положительной считается проба с характерным ростом микроорганизма, дающая изменение питательной среды (помутнение, осадок, хлопья и т.д.) или положительный результат (характерный рост микроорганизма) при пересеве на плотную питательную среду, или обнаружение

микроорганизмов в растворе применявшегося нейтрализатора. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более чем до 60 мин.

При необходимости эффективность разработанного режима проверяется в практических условиях.

Критерий эффективности обеззараживания – 100% гибель C.albicans.

Время обеззараживания – не более 60 мин.

Примечание: средство должно обладать стерилизующим действием.

1.3.3.3 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания стоматологических оттисков

При разработке режимов обеззараживания стоматологических оттисков в качестве тест-микроорганизма используют C. albicans. В качестве тест-объектов используют оттиски из альгинатных, силиконовых или других материалов. Для изготовления оттисков слепочную массу, полученную в соответствии с рекомендациями изготовителя, помещают в пластмассовую или металлическую ложку и делают оттиск с пластмассовых зубных протезов с моделированной десной. На оттиски наносят по 0,1 мл 1 мрлд суспензии C.albicans (с добавлением 40% инактивированной сыворотки), подсушивают их в течение 2-3 мин., затем полностью погружают в раствор ДС. При установленном фиксирующем действии ДС оттиски перед погружением в дезинфицирующий раствор промывают проточной питьевой водой. Параллельно для контроля контаминированные оттиски погружают в воду. Через определенное время (5-30 мин.) оттиски извлекают из раствора и марлевой салфеткой, пропитанной нейтрализатором, делают

смывы. Салфетки помещают в стерильные пробирки с бусами, содержащие 10 мл нейтрализатора, и встряхивают в течение 10 мин. Затем делают посев смывной жидкости на питательные среды для контроля эффективности обеззараживания.

Критерий эффективности обеззараживания – 100% гибель C. albicans при времени обеззараживания не более 60 мин.

1.3.3.4 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания предметов ухода за больными, игрушек

При изучении эффективности ДС используют тест-объекты, имитирующие предметы ухода за больными, или непосредственно предметы ухода (подкладные клеенки, резиновые грелки, судна, объекты из стекла и пластмасс: термометры, пластмассовые наконечники для клизм и др.), игрушки (пластмассовые, металлические, деревянные, резиновые, кроме мягких).

В качестве тест-микроорганизмов используют C. albicans и T.gypseum. Для имитации загрязнения используется 40% инактивированной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. Для этого перед контаминацией объектов к суспензии тест-грибов добавляют необходимое количество сыворотки.

Перед контаминацией тест-грибами тест-объекты подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой.

После подсушивания контаминированные тест-объекты располагают горизонтально и на них пипеткой наносят суспензию тест-грибов из расчета 0,5 мл 2-миллиардной взвеси на площадь в 100 $см^2$. Суспензию равномерно распределяют по поверхности тест-объектов стеклянным шпателем, подсушивают (до полного высыхания)

при комнатной температуре 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором.

Обработку предметов ухода за больными и игрушек проводят способами протирания, погружения и для крупных игрушек – орошения (капельное).

Норму расхода дезинфицирующего раствора при обеззараживании способами протирания или орошения определяют в зависимости от способа обработки аналогично опытам по обеззараживанию поверхностей (п.1.3.3.6.). Двукратное протирание или орошение проводят через 5-15 мин. после первого.

При обработке способом погружения в дезинфицирующий раствор предметов ухода за больными и мелких игрушек последний должен полностью и с избытком покрывать все объекты. При погружении мелких игрушек необходимо препятствовать их всплытию.

Время обеззараживания объектов определяют в интервале от 15 до 120 мин. в зависимости от вида тест-гриба и наличия органического загрязнения.

Контрольные тест-объекты обрабатывают стерильной питьевой водой из того же расчета, что и опытные.

Контроль эффективности обеззараживания тест-объектов проводят следующим образом: марлевой салфеткой (размером 5х5 см), смоченной в растворе нейтрализатора соответствующего для данного ДС, тщательно протирают тест-объект и погружают ее в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин. при постоянном встряхивании. Отмывную жидкость сеют на 2-3 чашки по 0,2-0,5 мл в каждую на твердые питательные среды.

Посевы помещают в термостат при температурах 27±1°С и учитывают результаты через 2-28 суток в зависимости от вида тест-микроорганизма.

Критерий эффективности обеззараживания – не менее 100% гибели тест-грибов.

Время обеззараживания объектов, контаминированных C.albicans, T.gypseum – не более 120 мин.

1.3.3.5 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания белья

Эффективность обеззараживания белья ДС определяют с помощью тест-объектов, представляющих собой кусочки ткани из бязи размером 2х2 см. В качестве тест-культур используют грибы C.albicans и T.gypseum. Стерильные тест-объекты пропитывают 2-х млрд. суспензией тест-грибов из расчета 20 мл на 10 тест-объектов и подсушивают в термостате. Далее контаминированные тест-объекты помещают в стерильные бязевые мешочки размером 5х8 см по 2 штуки в каждый.

При разработке режима обеззараживания загрязненного белья к суспензии грибов перед контаминацией тест-объектов добавляют 40% инактивированной сыворотки (6 мл 2-х млрд взвеси C.albicans или T.gypseum смешивают с 4 мл инактивированной сыворотки) или 40% фекальной эмульсии (6 мл 2-х млрд взвеси C.albicans смешивают с 4 мл фекальной эмульсии). Для приготовления фекальной эмульсии 8 г фекалий растирают в ступке с 20 мл воды. Контаминированные тест-объекты подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 20-25 мин. или 1,5-2 часа при комнатной температуре до полного высыхания.

При разработке режимов обеззараживания белья, не загрязненного выделениями, белье погружают в емкость с дезинфицирующим раствором из расчета 4 л раствора на 1 кг сухого белья. При разработке режимов обеззараживания белья, загрязненного выделениями, его погружают в емкость с дезинфицирующим раствором из расчета 5 л раствора на 1 кг сухого белья. Белье погружают в раствор последовательно, одну вещь за другой, следя за тем, чтобы между вещами не образовывалось воздушных полостей, препятствующих процессу дезинфекции. Мешочки с контаминированными тест-объектами распределяют между слоями белья (сверху, в середине, внизу). Через заданное время воздействия дезинфектанта (например, 15, 30, 60 мин.) извлекают по 1 мешочку с каждого уровня, стерильным пинцетом вынимают тест-объекты, переносят их в раствор нейтрализатора на 5 мин., затем промывают 5 мин. в стерильной питьевой воде, затем помещают в жидкие питательные среды. В контрольных опытах вместо дезинфицирующего раствора используют стерильную питьевую воду.

Критерий эффективности – 100% гибель тест-грибов.

Время обеззараживания (мин.) белья без видимых загрязнений, контаминированного C.albicans, T.gypseum – не более 240.

Время обеззараживания (мин.) белья, загрязненного выделениями и контаминированного C.albicans, T.gypseum – не более 240.

1.3.3.6 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей

Исследования проводят в зависимости от вида поверхностей, их положения (горизонтальное, вертикальное), способа и кратности обработки.

При разработке режимов обеззараживания поверхностей используют поверхности размером 10х10 см из различных материалов: гладкие, шероховатые, впитывающие и не впитывающие (деревянные, оштукатуренные, поверхности, окрашенные масляной, силикатной, водоэмульсионной или клеевой краской; оклеенные обоями, поверхности из линолеумных покрытий, поверхности из окрашенного или неокрашенного металла – нержавеющая хром-никелевая кислотостойкая сталь, пластика, стекла, искусственной или натуральной кожи, поверхности из облицовочной плитки – кафельной и метлахской, фаянса и др.), но не менее 5 видов поверхностей. В качестве тест-культур используют C.albicans, T.gypseum; A.niger используют для разработки режимов обеззараживания поверхностей с целью профилактики и борьбы с плесенью. Для имитации загрязнения поверхностей санитарно-технического оборудования при контаминации C.albicans, T.gypseum используют белковое загрязнение в виде 40% инактивированной лошадиной сыворотки; Для имитации загрязнения поверхностей унитазов при контаминации C.albicans используют загрязнение в виде 40% фекальной эмульсии. Для этого перед контаминацией объектов к суспензии грибов C.albicans, T.gypseum добавляют необходимое количество сыворотки и к суспензии C.albicans – необходимое количество фекальной эмульсии.

Перед контаминацией культурой грибов поверхности подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой (за исключением поверхностей, оклеенных обоями и окрашенных клеевой краской). Последние протирают несколько раз стерильной салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой.

Высушенные поверхности располагают горизонтально и на них пипеткой наносят взвесь тест-грибов из расчета 0,5 мл 2 миллиардной

микробной взвеси на площадь в 100 $см^2$. Культуру равномерно распределяют по поверхности стеклянным шпателем. Поверхности подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором.

При изучении эффективности обеззараживания линолеум, плитку метлахскую, искусственную или натуральную кожу, стекло располагают горизонтально, а дерево, окрашенное масляной, силикатной, водоэмульсионной или клеевой красками, поверхности, оклеенные обоями, пластик, кафельную и фаянсовую плитки – вертикально.

Обработку поверхностей проводят способами протирания или орошения (крупнокапельное и аэрозольное).

Для определения нормы расхода при однократной обработке дезинфицирующий раствор наносят с помощью пипетки на поверхность размером 10х10 см при применении способа протирания в количестве 1,0, 1,5 или 2,0 мл, а при крупнокапельном орошении наносят с помощью дозатора 1,5-3,0 мл. При аэрозольном методе обработки изучают эффективность обеззараживания при норме расхода 30-50-100 $мл/м^2$ (в зависимости от вида аэрозольного генератора и применяемой аэрозольной насадки). Многократное протирание или орошение проводят с интервалом между обработками 5-15-30 мин.

Время обеззараживания поверхностей определяют в интервале от 5 до 120 мин. Выбор экспозиции зависит от назначения и рекомендуемых условий применения средства.

Контрольные поверхности обрабатывают стерильной питьевой водой также и из того же расчета, что и опытные.

Исследования проводят при комнатной температуре. При необходимости оценивают эффективность обеззараживания поверхностей при пониженной до минус 30°С температуре (исследования проводят в холодильной камере).

Для контроля эффективности обеззараживания тест-поверхностей марлевой салфеткой (размером 5х5 см), смоченной в растворе соответствующего для данного дезинфицирующего средства нейтрализатора, тщательно протирают тест-поверхность, затем ее погружают в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин при постоянном встряхивании. Отмывную жидкость сеют (на 2-3 чашки по 0,1-0,2 мл в каждую) на твердые дифференциально-диагностические питательные среды.

Посевы выращивают в термостате при температуре плюс 27±1°С. Учет результатов проводят в течение 2-7 суток (C.albicans, A.niger) и 21-28 суток (T.gypseum) путем подсчета количества выросших колоний, затем рассчитывают плотность контаминации 100 $см^2$ поверхности и % обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%.

Критерий эффективности обеззараживания поверхностей – не менее 99,99% гибели тест-грибов; время обеззараживания (мин.) при контаминации C.albicans, T.gypseum – не более 240, A.niger – не более 360.

1.3.3.7 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживании посуды

В зависимости от назначения ДС исследования проводят при обеззараживании посуды столовой и кухонной, лабораторной и из-под выделений.

В качестве тест-объектов при разработке режимов обеззараживания столовой и кухонной посуды используют тарелки, стаканы, кружки из различных материалов (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью); столовые приборы - ножи, вилки, ложки из различных материалов (нержавеющая сталь, алюминий, пластик); лабораторной посуды (предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического анализа и др.); посуды из-под выделений - подкладные судна, мочеприемники, горшки, плевательницы и др. или тест-объекты их имитирующие. В качестве тест-микроорганизмов при контаминации столовой посуды используют C.albicans, лабораторной – C.albicans, T.gypseum.

При разработке режимов обеззараживания посуды с остатками пищи суспензию C.albicans смешивают с овсяной, манной или другой кашей, сваренной на молоке со сливочным маслом (к 10 г каши добавляют 1 мл 2-х миллиардной микробной взвеси).

Для имитации загрязнения чайной посуды используют кисель (к 10 г киселя добавляют 1 мл 2-х миллиардной суспензии C.albicans), лабораторной посуды – 40% инактивированной сыворотки (6 мл 2-х млрд суспензии C.albicans или T.gypseum смешивают с 4 мл инактивированной сыворотки), а посуды из-под выделений – 40% фекальную эмульсию, контаминированную C.albicans (на 10 мл – 1 мл $2 \cdot 10^9$ суспензии).

Перед контаминацией тест-грибами посуду (столовую и лабораторную) и столовые приборы подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой. Посуду располагают горизонтально и на нее пипеткой наносят взвесь тест-грибов из расчета 0,5 мл 2-х миллиардной суспензии на площадь в 100 $см^2$. Культуру равномерно

распределяют по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы для контаминации погружают в бактериальную суспензию на 1-2 мин., оставляя незараженными их ручки.

Посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают дезинфицирующим раствором

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды и столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор. Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора 18-20°С. При необходимости изучают эффективность растворов, имеющих температуру 50°С.

Контролем служит аналогично контаминированная посуда, которая погружается в такой же объем стерильной питьевой воды.

Дезинфицирующий раствор должен полностью и с избытком покрыть всю посуду (столовую и лабораторную) и столовые приборы (из расчета не менее 2 л на 1 комплект).

Через определенные интервалы времени (например, 15, 30, 60 мин. и т.д.) извлекают из дезинфицирующего раствора по одному предмету (например, тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т.д.) и стерильной марлевой салфеткой (размер 5х5 см), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС; тщательно протирают контаминированную часть каждого предмета, погружают салфетку в 10 мл этого же нейтрализатора, находящегося в пробирках с бусами. Время отмыва марлевой салфетки 10 мин. при постоянном встряхивании. После отмыва марлевую салфетку погружают в соответствующую жидкую питательную среду. Отмывную жидкость сеют на 2-3 чашки по 0,2-0,5 мл в каждую на твердые питательные среды.

Посевы помещают в термостат при температуре 27±1°С и учитывают результат через 2-7 суток (C.albicans) и 21-28 суток (T.gypseum).

Время обеззараживания посуды определяют в интервале от 15 до 240 мин. в зависимости от вида тест-микроорганизма и наличия загрязнения.

Критерий эффективности обеззараживания – не менее 100% гибель тест-грибов.

Время обеззараживания столовой посуды без остатков пищи, контаминированной C.albicans – не более 60 мин.

Время обеззараживания посуды с остатками пищи, контаминированной C.albicans – не более 120 мин.

Время обеззараживания лабораторной посуды, контаминированной C.albicans, T.gypseum – не более 120 мин.

Время обеззараживания посуды из-под выделений, контаминированной C.albicans – не более 120 мин.

1.3.3.8 Исследование фунгицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений

ДС, предназначенные для обеззараживания выделений, должны обладать способностью гомогенизировать органический субстрат (фекалии, мокрота). Препараты, не обладающие этим свойством, для обеззараживания выделений не пригодны.

Изучение активности дезинфицирующих средств при обработке выделений проводят с учетом их консистенции и соотношения с дезинфицирующим раствором или сухим препаратом.

В качестве тест-микроорганизмов при разработке режимов обеззараживания выделений используют C.albicans.

Определение эффективности обеззараживания мочи проводят следующим образом: берут несколько пробирок, наливают в них по 9 мл мочи, прибавляют по 1 мл суспензии C.albicans, содержащей $1 \cdot 10^9$ мк/мл. Неразведенное ДС или его растворы добавляют к моче в различных соотношениях (равном, двойном и т.д.). По истечении времени воздействия (15, 30, 60, 90, 120 мин.) пипеткой берут 1 мл опытной смеси и переносят в нейтрализатор объемом 9 мл, а затем из нее 1 мл смеси в пробирку с 5 мл бульона. После тщательного перемешивания 1 мл переносят во вторую пробирку с бульоном, а затем делают посевы по 0,1 мл на твердые питательные среды, как из первой, так и из второй пробирок. Чашки Петри с посевами ставят в термостат.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к моче не дезинфицирующего раствора, а стерильной питьевой воды.

Эффективным считают ДС, обеспечивающее 100% гибель C.albicans в 3 опытах с совпадающими результатами.

Определение эффективности обеззараживания фекалий: 20 г фекалий растирают в ступке и добавляют 80 мл стерильной воды. Полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, разливают в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл суспензии культуры C.albicans, содержащей $1 \cdot 10^9$ мк/мл.

Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным количеством дезинфицирующего раствора или вносят различное количество сухого препарата. После контакта с ДС производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через двое суток.

При положительных результатах проводят опыты с большим количеством оформленных фекалий (200-250 г). Для этого помещают их

в сосуд и заливают дезинфицирующим раствором в равном или двойном количестве по отношению к весу фекалий или засыпают сухим препаратом. Затем небольшую часть фекальных масс стеклянной палочкой перемешивают с жидкостью, а остальную массу оставляют в виде небольших комочков. Через определенные промежутки времени (30, 60, 90 и 120 мин.) проводят раздельные высевы жидкой части и комочков.

Жидкую часть фекальных масс набирают пипеткой и производят посев так же, как мочи. Плотные части фекалий забирают петлей и опускают в 5 мл питательной среды, растерев их о край пробирки и тщательно перемешав с бульоном; затем переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, также содержащую 5 мл бульона. Как из первой, так и из второй пробирки производят посев по 0,1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к фекальной эмульсии стерильной воды вместо ДС.

Об эффективности исследуемого ДС судят на основании 3 опытов с совпадающими результатами. Эффективным считают средство, обеспечивающее 100% гибель C.albicans в обеззараживаемом материале.

Критерий эффективности обеззараживания выделений – 100% гибель тест-гриба. Время обеззараживания выделений, контаминированных C.albicans – не более 6 часов.

1.4 Методы определения активности антимикробных материалов (тканей, лакокрасочных покрытий).

Определение активности антимикробных материалов проводят комплексно с использованием методов: «агаровых пластин» и капельного нанесения тест-микроорганизмов на тест-образцы из антимикробных материалов.

Оценка активности антимикробных тканей. Определение антимикробной активности текстильных материалов проводят с использованием метода «агаровых пластин». При оценке активности тканей контролем служат образцы тканей тех же артикулов, не содержащие антимикробных веществ.

Для определения антимикробной активности тканей в зависимости от целевого назначения используют следующие тест-микроорганизмы: S.aureus, E.coli, Mycobacterium terrae, T.gypseum.

Метод «агаровых пластин» дает качественную оценку антимикробной активности исследуемых образцов, так как он позволяет определить наличие или отсутствие антимикробного эффекта.

Методически он может быть выполнен двумя способами.

Способ № 1. Растопленный на водяной бане и охлажденный до 45°С питательный агар (100 мл) смешивают с 1 мл взвеси тест-микроорганизма, содержащей 10^8 КОЕ/мл, и разливают в чашки Петри по 20 мл. На поверхность застывшего агара накладывают тест-образцы испытываемой ткани размером 2х2 см. Чашки помещают в термостат при 28°С или 37°С в зависимости от тест-микроорганизма. Учет результатов антимикробной активности в отношении S.aureus и E.coli проводят через 24-48 часов, в отношении Mycobacterium terrae – через 5 суток, в отношении T.gypseum – через 21-28 суток определяя величину зон задержки роста микроорганизмов путем измерения

расстояния от края тест-образца до границы роста микроорганизмов вокруг теста.

Способ № 2. К 16-часовой бульонной культуре E.coli или S.aureus добавляют 0,9% раствор поваренной соли в соотношении 1:2. В стерильные чашки Петри наливают 12 мл питательного агара; после застывания на его поверхности равномерно распределяют шпателем 0,1 мл приготовленной взвеси тест-культур; затем сверху помещают тест-образцы ткани размером 2х2. Выращивание тест-культур и учет результатов проводят как в первом способе.

Критерии лабораторной оценки эффективности антимикробных тканей.

Антимикробные ткани, исследованные методом «агаровых пластин», считают эффективными, если зона задержки роста тест-микроорганизмов не менее 4 мм.

Антимикробная активность тканей не должна снижаться при многократных (не менее 10) стирках более чем на 15%.

Оценка антимикробной активности лакокрасочных покрытий.

Определение антимикробной активности лакокрасочных покрытий проводят с использованием капельного нанесения тест-микроорганизмов. В качестве тест-микроорганизмов используют E.coli и S.aureus. В зависимости от предполагаемой области применения антимикробных покрытий перечень тест-микроорганизмов может быть расширен (Mycobacterium terrae, C. albicans, A.niger).

На тест-поверхность размером 10х10 см, окрашенную антимикробной краской или покрытую антимикробным лаком, стерильной пипеткой наносят 0,5 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей $2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. После необходимой дезинфекционной выдержки в течение определенного промежутка времени в период

от 30 мин до 24 часов с поверхности берут смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной стерильным раствором нейтрализатора. Салфетки помещают в пробирки с бусами, содержащие 10 мл нейтрализатора и в течение 5-10 мин. встряхивают. Затем проводят посевы смывной жидкости на плотные питательные среды. Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальным для роста использованного тест-микроорганизма. В качестве контроля используют поверхности, окрашенные краской или покрытые лаком, не содержащими антимикробных веществ. Активность лакокрасочных материалов оценивают путем расчета процента снижения микробной обсемененности опытного образца по сравнению с контрольным.

Критерий антимикробной активности лакокрасочных покрытий – снижение обсемененности не менее чем на 90% через 24 часа после нанесения тест-микроорганизмов, указанных выше.

Изучение пролонгированного действия лакокрасочных материалов. Изучение пролонгированного действия лакокрасочных покрытий проводят на тест-поверхностях с дополнительной искусственной контаминацией тест-микроорганизмами.

На тест-поверхности регулярно 1 раз в неделю в течение 6 месяцев наносят по 0,5 мл суспензии тест-микроорганизмов, содержащей 10^6 КОЕ/мл. Эффективность обеззараживания оценивают 1-2 раза в месяц.

Критерий антимикробной активности ЛКМ – снижение обсемененности не менее, чем на 90% через 24 часа после нанесения тест-микроорганизмов и пролонгированное антимикробное действие не менее 6 мес.

1.5 Методы определения эффективности ДС в практических условиях

1.5.1 Общие положения

Изучение эффективности ДС в практических условиях является заключительным этапом исследования, по результатам которого даются рекомендации для его промышленного производства и применения в практике медицинской дезинфекции. Практические испытания проводятся в тех случаях, когда ДС содержит новое действующее вещество и требуется подтверждение эффективности разработанных режимов.

Целью практических испытаний является уточнение целевого назначения, условий применения, дается оценка эффективности и безопасности разработанных режимов обеззараживания, надежности рекомендованных мер предосторожности, влияния на фактуру и функциональные свойства обрабатываемых объектов, выявления преимуществ и недостатков по сравнению с используемыми аналогами.

Испытания проводят в медицинских организациях и/или инфекционных очагах в соответствии с Программой и Методическими указаниями по испытанию ДС, которые составляются на основании результатов ранее проведенных исследований по физико-химическим свойствам, антимикробной и дезинфицирующей активности, а также токсичности в лабораторных условиях.

В Программе должны быть указаны сроки (длительность), место проведения и цель испытаний, перечень объектов обработки, контроль параметров, объем (количество смывов).

Методические указания по проведению испытаний должны содержать конкретные сведения о назначении ДС, его характеристику (описание, физико-химические и антимикробные свойства,

токсичность), способы приготовления рабочих растворов, условия и режимы применения, правила по технике безопасности и оказанию первой помощи при отравлениях.

Испытания ДС в практических условиях проводят сотрудники лечебно-профилактического учреждения или государственного учреждения дезинфекционного профиля, или Центров гигиены и эпидемиологии, или государственные унитарные предприятия, или дезинфекционной станции. Текущую дезинфекцию проводят в одном или двух многопрофильных медицинских организациях, а заключительную – не менее чем в 10 инфекционных очагах.

Перед проведением испытаний проводят входной химический контроль на соответствие опытной партии ДС требованиям Технических условий, и инструктаж медицинского персонала, проводящего испытания.

1.5.2 Определение эффективности ДС при обеззараживании различных объектов (поверхностей, белья, посуды и др.)

Оценку эффективности ДС проводят на основании обнаружения санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов в смывах, взятых с объектов до и после проведения обеззараживания.

При испытании ДС в очагах бактериальных инфекций контроль эффективности осуществляют по обнаружению E.coli – при кишечных инфекциях; S.aureus – при инфекциях дыхательных путей; S.aureus и M.tuberculosis – при туберкулезе (M.tuberculosis определяют только в очагах с обильным бацилловыделением у пациентов или при оценке эффективности обеззараживания мокроты). При вирусных и грибковых инфекциях контроль качества дезинфекции проводят на основании

обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов E.coli и S.aureus.

В МО об эффективности дезинфицирующего средства судят по обнаружению санитарно-показательной микрофлоры (E.coli и S.aureus), а также возбудителей внутрибольничных инфекций (P.aeruginosa, P.vulgaris, C.albicans, A.niger и других) в зависимости от профиля стационара и наличия внутрибольничной инфекции.

Для оценки эффективности ДС в практических условиях берут не менее 50 смывов (по 25 до и после дезинфекции). Пробы после дезинфекции отбирают сразу после окончания экспозиции и доставляют для анализа в лабораторию не позднее 2-х часов с момента их отбора. Пробы отбирают с объектов, имеющих эпидемиологическое значение, возможность повторной контаминации которых исключается спецификой их использования.

При ограниченных практических испытаниях, проводимых с участием исследователей ДС, из-за сложности выделения и культивирования некоторых возбудителей допускается использование тест-объектов, искусственно контаминированных микроорганизмами в лаборатории (например, при обеззараживании белья при туберкулезе, используют тесты, обсемененные Mycobacterium terrae, а при грибковых заболеваниях – T.gypsem).

Учет эффективности обеззараживания проводят качественным и количественным методами.

При качественном методе оценки эффективности пробы, взятые с объектов до и после дезинфекции, засевают на дифференциально-диагностические среды и проводят учет по наличию специфического роста микроорганизмов, определяя процент обнаружения микроорганизмов до и после дезинфекции. При количественном методе

отобранные пробы засевают на твердые питательные среды, подсчитывают число КОЕ и определяют не только процент положительных проб, но и плотность контаминации единицы поверхности.

После обеззараживания поверхностей в помещениях, мебели, санитарно-технического оборудования, посуды, игрушек пробы отбирают путем протирания поверхностей перечисленных объектов площадью 100 $см^2$ увлажненными в растворе нейтрализатора стерильными марлевыми салфетками размером 5х5 см или ватными тампонами.

При качественном методе оценки эффективности пробы, взятые с объектов до и после дезинфекции, засевают на дифференциально-диагностические среды и проводят учет по наличию специфического роста микроорганизмов, определяя процент обнаружения микроорганизмов до и после дезинфекции. При количественном методе отобранные пробы засевают на твердые питательные среды, подсчитывают число КОЕ и определяют не только процент положительных проб, но и плотность контаминации единицы поверхности.

При контроле эффективности обеззараживания мелких предметов смыв берут со всей поверхности (или полностью объект погружают в питательную среду), а объектов большой площади – с 2-3-х участков, общей площадью 100 $см^2$.

Эффективность средства при обеззараживании объектов в практических условиях оценивают, сравнивая контаминацию объектов до и после обработки.

Критерий эффективности при проведении заключительной дезинфекции – высев микроорганизмов не более 0,5%, при текущей

дезинфекции на дому – не более 3%, при текущей дезинфекции в лечебно-профилактических учреждениях – высев непатогенной микрофлоры не более 2% отобранных смывов.

1.5.3 Определение эффективности ДС при обеззараживании медицинских изделий

Медицинские изделия после использования у пациента делят на 2 группы. С изделий 1-ой группы берут смыв для определения микробного фона при испытаниях. Изделия медицинского назначения (включая эндоскопы) из 2-ой группы обеззараживают в соответствии с режимами и при условиях, рекомендованных в Методических указаниях (Инструкциях) по испытанию конкретного средства.

Контроль качества дезинфекции медицинских изделий осуществляют методом смывов. Взятие смывов производят стерильными марлевыми салфетками размером 5х5 см, простерилизованными в бумажных пакетах или чашки Петри.

Контролю подлежит 1% одновременно обработанных изделий одного наименования, но не менее 3-5 единиц.

Перед взятием смывов с объектов в широкогорлые пробирки со стеклянными бусами стерильной пипеткой разливают по 10 мл стерильного нейтрализатора, соответствующего применяемому дезинфицирующему средству. Увлажненной стерильной салфеткой протирают поверхность изделия, после чего салфетку помещают в пробирку с раствором нейтрализатора и 5 мин. встряхивают.

У изделий, имеющих каналы, рабочий конец изделия опускают в пробирку со стерильным нейтрализатором и с помощью стерильного шприца или пипетки 1-2 раза промывают канал этим раствором. После

этого из смывной жидкости производят высев на дифференциально-диагностические среды.

Контроль обеззараживания эндоскопов осуществляют методом взятия смывов с участков эндоскопа, труднодоступных для очистки и дезинфекции, например, дистальный конец эндоскопа, а также путем микробиологического контроля смывной жидкости, в первую очередь, из инструментального канала эндоскопа, а также других каналов, полостей и поверхностей.

О качестве дезинфекции после ее проведения судят по отсутствию на медицинских изделиях золотистого стафилококка, синегнойной палочки и бактерий группы кишечной палочки.

Для обнаружения микроорганизмов в смывной жидкости ее пропускают через мембранный фильтр и затем его помещают на поверхность плотной дифференциально-диагностической среды. При отсутствии фильтрующего устройства смывную жидкость по 0,1 мл засевают на поверхность желточно-солевого, кровяного агара и среду Эндо. Посевы выдерживают в термостате при плюс 37°С в течение 48 часов.

При наличии роста микроорганизмов на агаре их идентификацию проводят в соответствии с действующими методическими документами.

1.5.4 Определение активности изделий из антимикробных тканей

Оценку эффективности изделий из антимикробных тканей проводят в медицинских организациях и на промышленных предприятиях, где условия труда способствуют развитию заболеваний кожных покровов микробной этиологии, или на которых требуется обеспечение незначительного количества микроорганизмов в воздухе и на поверхностях.

Набор изделий из антимикробной ткани, подлежащих испытанию, определяют конкретно для каждого учреждения. Обычно в МО и на предприятиях это нательное и постельное белье, спецодежда персонала.

Во всех учреждениях, наряду с изделиями из испытываемой ткани (опытная группа), исследуется группа аналогичных изделий из обычной ткани (контрольная группа), желательно того же артикула, что и опытная группа.

Микробную обсемененность изделий из антимикробных тканей изучают методом отпечатков. Предметные стекла, разрезанные пополам, раскладывают стерильным пинцетом в стерильные чашки Петри (три половинки предметного стекла). Питательную среду (в зависимости от тест-микроорганизма – казеиновый или мясопептонный агар, агар Сабуро, картофельно-глицериновый агар) растапливают на водяной бане и при помощи пипетки, соблюдая правила асептики, наливают на поверхность каждого стекла до его полного покрытия (1,5-2,0 мл). Чашки с пластинками после застывания среды можно сохранять до 3 суток в холодильнике.

Взятие посевов-отпечатков проводят следующим образом: приоткрыв чашку с пластинками, берут стерильным пинцетом пластинку за края, не касаясь питательной среды. Извлекают пластинку из чашки и плотно прикладывают питательной средой к испытываемой поверхности на 2-3 секунды. После соприкосновения с поверхностью пластинки с питательной средой отпечатком кверху помещает в чашку Петри. Чашку закрывают крышкой и ставят в термостат при 37±1°С на 48 часов, после чего производят подсчет выросших колоний. В посеве-отпечатке сохраняется естественное расположение микробных клеток.

При определении обсемененности белья пробы отбирают методом отпечатков с внутренней поверхности нательного белья в области спины (верхний край лопатки), средней линии живота между пупком и грудиной, груди/область грудных желез, над грудными сосками. Пробы отбирают симметрично с левой и правой стороны. С наружной поверхности нательного белья пробы берут в подмышечной области и в области плечевого шва.

С наволочек, полотенец отбирают пробы в трех точках. С пододеяльников, простыней, мягкого инвентаря /шторы, ширмы, мешки для белья/ отбирают по 3-5 проб по углам и в середине.

Антимикробная активность тканей не должна снижаться при многократных (не менее 30) стирках более чем на 15%.

Критерий эффективности – отсутствие роста микроорганизмов в отобранных пробах.

1.5.5 Определение антимикробной активности лакокрасочных покрытий

Определение антимикробной активности лакокрасочных материалов в практических условиях является заключительным этапом исследования, по результатам которого даются рекомендации для применения в практике медицинской дезинфекции.

В соответствии с назначением лакокрасочных материалов поверхности в помещении окрашивают краской или покрывают лаком. Контролем служат поверхности других аналогичных помещений, обработанных лакокрасочными материалами, не содержащими биодобавок.

Оценку антимикробной активности лакокрасочных покрытий проводят на основании обнаружения санитарно-показательных и

патогенных микроорганизмов в смывах, взятых с поверхностей, окрашенных испытуемой краской или покрытых лаком. В качестве контроля используют поверхности, окрашенные краской или покрытые лаком, не содержащими биодобавок.

Оценку антимикробной активности лакокрасочных материалов проводят количественным методом: отобранные пробы засевают на твердые питательные среды, подсчитывают число КОЕ и определяют процент снижения микробной обсемененности по сравнению с контролем.

Антимикробное покрытие считают эффективным при обеспечении снижения обсемененности по сравнению с контрольными поверхностями через 24 часа не менее, чем на 90% и длительности антимикробного действия не менее 6 мес.

1.6 Методы изучения и оценки вирулицидной активности дезинфицирующих средств

1.6.1. Общие положения

Методы изучения и оценки вирулицидной активности ДС гармонизированы с Европейским стандартом 14476. «Химические дезинфектанты и антисептики. Вируцидный количественный суспензионный тест для химических дезинфектантов и антисептиков, используемых в медицине – Тест-методы и требования (фаза 2/ступень 1)», 2005г.; «Протоколом тестирования эффективности дезинфектантов, используемых для инактивации вируса гепатита В уток и поддержания соответствующего уровня требований», EPA 2000г., США; «Комиссии по антивирусной дезинфекции Немецкого Объединения по борьбе с вирусными заболеваниями (DVV)», 2004.

Вирусы обладают разной устойчивостью к действию физических и химических факторов, в том числе ДС и субстанций. Устойчивость вирусов к ДС определяется их структурой и химическим составом. Более устойчивы к действию ДС вирусы без липидсодержащей оболочки, например, пикорнавирусы, парвовирусы. Вирусы с липидсодержащей оболочкой, например, вирусы гриппа, герпеса, ВИЧ относительно легко инактивируются. Механизм действия ДС на вирусы различен и зависит от химического состава. Они могут избирательно повреждать нуклеиновую кислоту вируса, белки нуклеокапсида или липопротеины суперкапсидной оболочки. Возможно синхронное воздействие на эти структурные элементы, дезинтеграция вирусной частицы или блокировка рецепторов на ее поверхности за счет накопления амфотерных веществ дезинфектанта. Для оценки вирулицидной активности следует использовать несколько тест-вирусов с различной устойчивостью, что позволяет оценить активность ДС в отношении широкого спектра вирусов.

Результаты исследований вирулицидной активности ДС зависят также от характера используемого вируссодержащего материала, метода индикации вируса, метода определения вирулицидных свойств ДС, состава испытываемого ДС (действующие вещества и другие компоненты).

При изучении вирулицидной активности ДС необходимо иметь его подробную характеристику с указанием рецептуры, физико-химических свойств (включая растворимость и стабильность), подтвержденных результатами входного химического контроля.

ДС, принимаемые для исследований, должны отвечать следующим требованиям: обладать хорошей растворимостью в воде, сохранять свою активность в присутствии органических веществ (кровь и др.

биологические субстраты), быть нетоксичными или мало токсичными для людей (и животных), не иметь неприятного запаха, не портить обеззараживаемых предметов.

Непременным условием при исследованиях вирулицидной активности ДС является использование нейтрализатора.

1.6.2. Тест-вирусы, модельные системы, критерии оценки и основные условия, которые необходимо соблюдать при исследованиях вирулицидной активности ДС и их субстанций. Применение нейтрализатора

Тест-вирусы. Модельные системы для исследований ДС и субстанций. При исследованиях вирулицидной активности ДС необходимо использовать как РНК-, так и ДНК-содержащие тест-вирусы (Приложение 1). При этом следует учитывать наличие лабораторной модели, безопасность для лиц, работающих с вирусом.

Обязательным для всех ДС является испытание на двух тест-вирусах: вирусе полиомиелита 1 типа (вакцинном штамме Sabin (LSc-2ab)(далее – «полиовирус»)) и аденовирусе 5 типа (штамм Аденоид 75) (далее – «аденовирус»)).

Средство, показавшее способность инактивировать полио- и аденовирус, включают в группу ДС с вирулицидной активностью. ДС с вирулицидной активностью могут быть использованы для дезинфекции при любой вирусной (включая особо опасные) инфекции, имеющей значение в инфекционной патологии человека.

Для ДС, применяемых при повышенной (до плюс 60°С) температуре растворов (например, для обеззараживания белья), в качестве тест-вируса используют бычий парвовирус (штамм Хаден).

В связи с эпидемиологической и социальной значимостью гепатита А, для дезинфекции в инфекционных очагах проводят также исследования с вирусом гепатита А. Для изучения и оценки активности ДС в отношении вируса гепатита А используют вирус гепатита А человека (штамм HAS–15). ДС, инактивирующие вирус гепатита А, входит в группу средств с вирулицидной активностью.

Для изучения вирулицидной активности ДС в отношении вируса гепатита В применяют суррогатный вирус – вирус гепатита В уток (ВГВУ), в отношении вируса гепатита С – суррогатный вирус – вирус диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота ВД-БС (штамм ВК-1В1-№28) или вирус гепатита С человека (штамм Д1).

Спектр тест-вирусов может быть расширен, в таком случае дают дополнительную информацию о результатах исследований на конкретном вирусе.

Модельные системы для исследований ДС и субстанций. Исследования in vitro в культуре клеток. В экспериментах используют культуры клеток, чувствительные к тест-вирусу.

Исследования in vivo. В экспериментах используют чувствительных лабораторных животных (белые мыши), уток и др. (Приложение 1).

Критерии оценки вирулицидной активности ДС и субстанций. Вирулицидное ДС (субстанция) должно подавлять инфекционность обязательных для испытаний тест-вирусов – полиовируса и аденовируса на исследуемых объектах не менее, чем на 4 log10 ТЦИД50 (то есть степень инактивации должна быть не менее 99,99%).

Критерием вирулицидной активности ДС (субстанций) для других тест-вирусов (включая вирусы-возбудители особо опасных инфекций)

является отсутствие инфекционности, определяемое современными методами индикации.

Степень инактивации тест-вируса определяют в чувствительных модельных системах по подавлению инфекционной, цитопатической или бляшкообразующей активности вируса в культуре клеток, или по отсутствию маркеров инфицирования, или по специфической гибели лабораторных животных (белые мыши) и др. Для получения более точных результатов тест-вирус следует использовать с максимальным титром.

Показателем вирулицидной активности ДС (субстанций) является скорость инактивации, которая представляет собой соотношение концентрации тест-вируса, выраженное в десятичных логарифмах, до и после воздействия ДС за определенный промежуток времени (экспозиция). Степень снижения вирусной инфекционности вычисляется в десятичных логарифмах по разнице титров вируса до и после обработки ДС.

Основные условия, которые следует соблюдать при исследованиях вирулицидной активности ДС и субстанций:

исследуемые ДС до, во время и после исследований (испытаний) должны храниться в соответствии с требованиями технических условий (ТУ). При отсутствии ТУ необходимо соблюдать общие требования: избегать попадания прямых солнечных лучей и влаги, воздействия высоких температур и замораживания;

при проведении сертификационных испытаний ДС хранят в соответствии с правилами сертификации;

растворы ДС готовить на стерильной водопроводной дехлорированной воде;

поддерживать температуру растворов исследуемых ДС в течение всего эксперимента в пределах 200±2°С (если по условиям эксперимента не рекомендована другая температура), независимо от температуры окружающей среды;

использовать рабочие растворы ДС, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и др. только после полного их растворения;

кратность постановки экспериментов должна быть не менее трех (при условии получения одинаковых результатов);

при отсутствии цитопатического эффекта пробы подвергают необходимой обработке с целью проведения второго, а при необходимости и третьего слепого пассажа для определения полноты ингибирования тест-вируса;

эксперименты должны сопровождаться всеми необходимыми контролями, в том числе контролем полноты нейтрализации дезинфектанта, жизнеспособности тест-вируса, контаминации тест-объекта тест-вирусом, культуры клеток или лабораторных животных (мыши), утки и др.;

использовать нейтрализатор, подобранный к конкретному ДС (или дезинфицирующей субстанции, далее в этом разделе – «ДС»);

при исследованиях ДС следует строго соблюдать рекомендуемые меры индивидуальной защиты (перчатки, очки, респираторы и др.).

Применение нейтрализатора ДС и субстанции. Для нейтрализации ДС (субстанции) используют вещество-нейтрализатор (или комплекс из нескольких веществ), останавливающее действие ДС. Нейтрализатор либо добавляют непосредственно в питательную среду, либо промывают им тест-объекты после воздействия ДС (субстанции, исследуемого вещества) для того, чтобы остановить его действие на тест-вирус через заданное время (экспозицию).

Для нейтрализации ДС в виде монопрепарата на основе окислителей (хлор-, йод-, кислородсодержащие средства) применяют 0,1-1,0% растворы тиосульфата натрия; для галоидактивных (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 (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.), производные гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.) – 0,1-1,0% растворы лаурилсульфата натрия (сульфонол) или растворы лаурилсульфата натрия с 10% обезжиренного молока или комплексный нейтрализатор (см. ниже); для альдегидов (глутаровый альдегид, глиоксаль, формальдегид, ортофталевый альдегид) – 1,0% раствор пиросульфита (метабисульфита) натрия или комплексный нейтрализатор (см. ниже); для кислот – щелочи в эквивалентном количестве; для щелочей – кислоты в эквивалентном количестве; для спиртов – разведение в воде до не действующей концентрации; для композиционных средств – «комплексный» нейтрализатор, например, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3-3%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%).

Если в состав ДС входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия. Следует иметь ввиду, что комплексный нейтрализатор обладает выраженным цитотоксическим действием на клеточные культуры.

Если не удается подобрать какой-либо из перечисленных нейтрализаторов, что проявляется в неспецифической дегенерации культуры клеток (или гибели мышей, уток), то используют 60%-80% сыворотки (без консерванта) крупного рогатого скота (СКРС), инактивированной при 56ºС в течение 30 мин. Сыворотка (без

консерванта) крупного рогатого скота нейтрализует большой перечень ДВ и наиболее близка к комплексному нейтрализатору.

При невозможности нейтрализовать токсическое действие ДС следует применять дополнительные методы удаления ДС – диализ смеси вирус-дезинфектант, например, с использованием сефадекса LH-20, G-75; осаждения вируса методом высокоскоростного центрифугирования или фильтрацией через мембранные фильтры.

1.6.3. Основные этапы и методы изучения вирулицидной активности ДС и субстанций.

Исследование вирулицидной активности ДС осуществляется в два этапа:

1) первый этап исследований – определение наличия вирулицидной активности, проводится in vitro суспензионным методом или методом батистовых тест-объектов;

2) второй этап исследований – изучение вирулицидной эффективности ДС при обработке ими различных тест-объектов, воздуха, контаминированных тест-вирусом.

В качестве тест-объектов следует использовать различные изделия медицинского назначения; предметы ухода за больными и игрушки; белье, спецодежду и др. изделия из тканей; посуду, в том числе лабораторную; различные поверхности в помещениях (жесткой мебели, разных предметов, оборудования, в том числе санитарно-технического и др.); кровь; выделения (моча, фекалии, мокрота).

Объем исследований и перечень объектов обеззараживания зависит от назначения ДС, их состава, токсикологической характеристики, формы выпуска средства и др.

1.6.3.1. Суспензионный метод.

К вирусной суспензии (ВС), в качестве которой может быть использована культуральная жидкость после удаления клеточных остатков, или ВС органов или тканей, или сыворотка крови, добавляют испытуемое средство в объеме 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) в различных концентрациях.

Суспензионный тест проводят в двух вариантах: без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой. В последнем случае к вирусной суспензии добавляется инактивированная сыворотка крупного рогатого скота из расчета 40% ее концентрации в смеси вирус – дезинфектант.

Полученную смесь (как с сывороткой, так и без нее) выдерживают при комнатной температуре (20±2°С) в течение 15-30-60 мин., нейтрализуют (в соотношении 1:1, то есть 1 объем смеси и 1 объем нейтрализатора), встряхивая в течение 5-10 мин., и используют для определения тест-вируса в чувствительной культуре клеток (или на мышах, или на утках).

Методика определения инфекционного вируса после воздействия ДС (субстанции): исследуемый материал (смесь вируса, ДС и нейтрализатора) вносят (или исследуемым материалом заражают мышей или уток) в лунки планшет (пробирки) с выращенным монослоем клеток или в суспензию клеток (в случае применения суспензионной культуры клеток), через 30-60 мин. удаляют смесь, заменяют ее культуральной средой. Культуру клеток инкубируют в термостате при температуре, необходимой для репродукции вируса в течение срока наблюдения.

О вирулицидной активности средства судят по наличию или отсутствию цитопатогенного действия, вызываемого вирусом, или по другим проявлениям, указывающим на репродукцию вируса.

Все эксперименты сопровождаются контролями культуры клеток, вируса, полноты нейтрализации.

Эффективным считают средство (субстанцию), обеспечивающее инактивацию вируса при времени воздействия не более 60 мин.

1.6.3.2. Количественный суспензионный метод (Республика Беларусь).

Температуру всех ингредиентов (суспензии тест-вируса, 2% раствора сывороточного альбумина, сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, бидистиллированной воды и разведения ДС) доводят до 20°С. Одну часть суспензии тест-вируса смешивают с одной частью раствора сывороточного альбумина, или одной частью сыворотки плодов крупного рогатого скота, или одной частью бидистиллированной воды. Затем в каждую из этих групп добавляют восемь частей разведенного ДС в концентрации в 1,25 раз более высокой, чем конечная (исследуемая) концентрация.

Эффективность ДС испытывают в группах без белка и с 0,2 % сывороточного альбумина или с 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (указаны конечные концентрации). Группы контроля тест-вируса должны содержать эти же концентрации белка.

В том случае, если суспензионный метод выполняется в варианте с нейтрализацией действия ДС, после завершения периода экспозиции к смеси суспензии тест-вируса и раствора ДС добавляют равное количество раствора нейтрализатора на 5 мин.

Затем готовят последовательные разведения смеси на охлажденной (0-40°С) среде поддержки (забуференном солевом растворе) с шагом 1:10 и пробирки (флаконы) немедленно помещают на лед. Этими разведениями инфицируют чувствительную культуру

клеток, и по результатам учета признаков репродукции тест-вируса определяют его остаточную инфекционность.

Поскольку при подготовке серии разведений происходит многократное разбавление ДС, возможен вариант постановки метода, когда нейтрализатор не используют. В этом случае добавляют контрольную группу начала экспозиции, в которой приготовление последовательных разведений и инфицирование ими заранее подготовленной культуры клеток производят сразу же после объединения суспензии тест-вируса и раствора ДС. Снижение инфекционности вируса определяют при этом как разность титров в группах начала и окончания экспозиции. Таким способом удается определить реальную эффективность ДС, несмотря на возможное продолжающееся вирулицидное и вирусингибирующее действие. Токсичность ДС для культуры клеток при таком подходе снижается в последовательных разведениях и, как правило, не выходит за пределы разведения 1:1000. Исходный титр тест-вируса в таком испытании должен быть достаточно высоким, не менее 7-8 lg ТЦИД 50/мл (БОЕ/мл). В связи с этим данный вариант исполнения метода более пригоден для высокорепродуктивных тест-вирусов, в частности, полиовируса и сходных с ним по степени устойчивости энтеровирусов, например, энтеровируса ECHO 6.

Необходимым условием выполнения испытания является использование ряда контролей:

а) контроль вируса: одну часть суспензии тест-вируса смешивают с 9 частями воды. Такой контроль предусматривают для каждого времени экспозиции или используют максимальную экспозицию;

б) контроль вируса с сывороточным альбумином или сывороткой: одну часть суспензии вируса смешивают с 1 частью раствора

сывороточного альбумина или одной частью сыворотки крупного рогатого скота, затем добавляют 8 частей воды;

в) контроль токсичности ДС: две части забуференного изотонического раствора хлорида натрия (PBS, модификация Dulbecco), смешивают с 8 частями разведенного ДС. Одновременно с определением инфекционности подготовленные серийные разведения этой смеси наносят на культуру клеток. Если цитотоксичность ДС так высока, что снижение инфекционного титра тест-вируса на 4 log10 ТЦИД50/мл (БОЕ/мл) в сравнении с контролем вируса не может быть достигнуто, используют подходящий метод ее снижения;

г) контроль токсичности смеси ДС + нейтрализатор: две части PBS смешивают с 8 частями разведенного ДС и объединяют с равным объемом раствора нейтрализатора. Одновременно с определением инфекционности подготовленные серийные разведения этой смеси наносят на культуру клеток. Контроль используют в случае выполнения суспензионного метода в варианте с нейтрализацией действия ДС;

д) контроль полноты нейтрализации ДС (или вирулицидного действия продуктов нейтрализации и остатка нейтрализатора): одну часть PBS смешивают с 8 частями разведенного ДС и объединяют с 10 частями раствора нейтрализатора. Через 5 мин. добавляют одну часть суспензии тест-вируса. Одновременно с определением инфекционности подготовленные серийные разведения этой смеси наносят на культуру клеток. Контроль используют в случае выполнения суспензионного метода в варианте с нейтрализацией действия ДС;

е) контроль начала экспозиции: все процедуры выполняют с тем отличием, что разведения смеси суспензии тест-вируса и ДС готовят в момент начала отсчета времени экспозиции для других проб. Разность между титрами вируса в данном контроле и в пробах с экспозицией

помогает определить степень падения инфекционности вируса только за время экспозиции (вычитается возможное продолжающееся действие ДС в ходе разведения и определения инфекционности проб). Контроль используют в случае выполнения суспензионного метода в варианте без нейтрализации действия ДС;

ж) контроль дезинфицирующего действия (референс-дезинфектант): одну часть суспензии тест-вируса смешивают с 4 частями фосфатного буфера (0,1М; pH 7,0) и 5 частями 1,4% раствора формальдегида. Экспозиция – 5, 15, 30 и 60 мин (для полиовируса, энтеровируса ECHO 6 – 15, 30, 60 и 120 мин.).

Вирулицидную активность ДС рассчитывают как разность между инфекционным титром тест-вируса в контроле полноты нейтрализации ДС и инфекционным титром, определенным после взаимодействия вируса и ДС в основных группах. Если исследование выполняют в варианте без применения нейтрализатора, вирулицидную активность вычисляют как разность между титром вируса в контроле начала экспозиции и его титром после завершения экспозиции.

Считают, что раствор ДС обладает достаточной вирулицидной активностью, если в пределах рекомендуемой экспозиции инфекционный титр вируса снижается, по меньшей мере, на 104 (4 log10) ТЦИД50/мл (БОЕ/мл).

1.6.3.3. Метод батистовых тест-объектов

Исследования вирулицидной активности ДС (субстанций) этим методом проводят на тест-вирусах, фиксированных на батистовых тест-объектах. При использовании данного метода происходит некоторая потеря (1-2 log ТЦИД50/мл) вирусных частиц во время погружения контаминированных тест-объектов в раствор ДС, нейтрализатор и при

последующем отмывании от остатков ДС. Однако этот метод более приемлем для изучения ДС, продукты нейтрализации которых токсичны для культуры клеток и вызывают в них неспецифические дегенеративные изменения.

Подготовка эксперимента.

Вирусной суспензией контаминируют батистовые тест-объекты (далее «тесты»).

В качестве тестов используют кусочки батиста размером 1х0,5 см, предварительно простиранного (то есть освобожденного от крахмала) и проглаженного. Тесты помещают в стерильную чашку Петри и заливают вирусной суспензией из расчета 0,05-0,1 мл жидкости на один тест (без сыворотки или с добавлением 40% сыворотки крупного рогатого скота). Тесты подсушивают при комнатной температуре не менее 60 мин. Контаминированные вирусной суспензией тесты используют в опытах. Тесты не следует заготавливать впрок, их контаминируют вирусной суспензией ex tempore.

При исследовании вирулицидной активности готовят 3-5 концентраций раствора ДС на стерильной дехлорированной водопроводной воде из расчета 1,0 мл раствора на каждый тест.

Постановка эксперимента.

В исследуемые растворы погружают контаминированные ВС тесты по 5 штук на каждую экспозицию.

Момент смачивания тестов раствором ДС является началом опыта и с этого момента отсчитывают экспозицию. Через 5-15-30-45-60 мин. стерильным охлажденным пинцетом или петлей извлекают по 5 тестов, помещают их в пробирку с бусами (из стекла, пластика) с 5 мл стерильного раствора нейтрализатора, помещают в шуттель-аппарат на 10 мин.

По истечении каждой экспозиции смывной жидкостью заражают культуру клеток (мышей, уток). Культуру клеток, отмытую от ростовой среды, оставляют на контакт на 30-60 мин. для адсорбции вируса. Затем клетки промывают раствором Хенкса и заливают поддерживающей средой с сывороткой. Клетки инкубируют в термостате при оптимальной для конкретного вируса температуре.

Критерием вирулицидной активности ДС является снижение количества вируса не менее, чем на 4 $\log_{10}$ при времени дезинфекционной выдержки не более, чем 60 мин.

Контроль культуры клеток.

С этой целью оставляют незараженными пробирки с культурой клеток и наблюдают в течение максимального срока опыта. При работе с культурой клеток в контрольных пробирках также, как и в опытных, при необходимости меняют поддерживающую среду в зависимости от изменения pH.

Контроль вируса.

С этой целью 5 штук тестов, контаминированных вирусом, помещают в пробирку с 5 мл раствора Хенкса, выдерживают максимальную экспозицию, используемую в эксперименте; переносят в пробирки с 5 мл нейтрализатора и бусами, встряхивают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. и заражают культуру клеток (или другой чувствительный биологический объект) соответствующей дозой (0,2 мл или менее) жидкости, отмытой с тестов. Для выяснения количества жизнеспособного вируса проводят титрование.

Неспецифический цитопатический эффект (ЦПЭ) может быть при неполной нейтрализации дезинфектанта или цитотоксическом эффекте смеси «дезинфектант + нейтрализатор». Исключить неспецифический цитотоксический эффект в некоторых случаях удается путем

дополнительного отмыва монослоя раствором Хенкса после контакта клеток с внесенной пробой с нейтрализатором в течение 60 мин. для адсорбции вируса на поверхности клеток. По истечению этого времени добавляют поддерживающую среду. Избежать неполной нейтрализации можно путем тщательной отработки условий нейтрализации или поиска другого нейтрализатора.

Контроль контаминации вирусом тестов. С этой целью 5 штук тестов, контаминированных вирусом помещают в пробирку с бусами и с 5 мл физиологического раствора, отмывают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. и соответствующей дозой (0,2 мл или менее, как в опыте) жидкости, отмытой с тестов, заражают культуру клеток (или другой биологический объект). Для определения степени контаминации тестов вирусом проводят титрование.

Контроль полноты нейтрализации ДС.

С этой целью 5 штук тестов (без вируса) помещают на максимальную экспозицию, используемую в эксперименте, в 5 мл раствора максимальной концентрации ДС. После этого тесты переносят на 5 минут в 5 мл раствора нейтрализатора, отмывают с бусами в течение 10 минут и вносят (по 0,2 мл или менее) смыв, с тестов в культуру клеток (или другой биологический объект).

Исследования вирулицидной активности субстанции завершаются первым этапом.

Исследования вирулицидной активности ДС, предназначенных для дезинфекции при особо опасных вирусных инфекциях завершаются первым этапом, если возбудитель по устойчивости к конкретному ДС не превышает полиовирус и аденовирус.

После получения данных о наличии у ДС вирулицидной активности исследования продолжаются на втором этапе – изучении эффективности при обеззараживании различных объектов.

Эффективным считают средство (субстанцию), обеспечивающее инактивацию вируса при времени воздействия не более 60 мин.

1.6.4. Методы изучения и оценки вирулицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания различных объектов, контаминированных тест-вирусами

Исследования эффективности ДС при обеззараживании различных объектов (изделия медицинского назначения, включая эндоскопы, посуда, белье, поверхности, выделения и др.), имеющих эпидемиологическое значение в распространении инфекционных заболеваний вирусной этиологии, проводят с целью разработки эффективных режимов дезинфекции. Полученные положительные результаты в опытах на тест-вирусах уточняют (при необходимости) на вирусах — возбудителях той инфекции, при которой они будут использованы, учитывая их специфику и механизм передачи инфекции. Объем исследований ДС зависит от их предполагаемого назначения и может включать все или некоторые из приведенных ниже объектов.

1.6.4.1 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий

1.6.4.1.1 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий (кроме эндоскопов) из различных материалов.

В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и др. медицинских изделий (в том числе однократного применения): имеющие замковые части (щипцы, ножницы, корнцанг), не имеющие, замковых частей (пинцеты, шпатели); стоматологические, в том числе

вращающиеся, инструменты (боры, буравы корневые, зеркала, диски шлифовальные) из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их тест-объекты.

Контаминация изделий тест-вирусом.

Простерилизованные или продезинфицированные (способом кипячения) тест-изделия контаминируют ВС с добавлением 40 процентов инактивированной (без консерванта) СКРС в качестве органической нагрузки (например, к 6 мл вирусной суспензии добавляют 4 мл неразведенной сыворотки), перемешивают. Если средство обладает фиксирующими свойствами, то сыворотку в качестве белковой нагрузки добавляют в количестве 5%.

Приготовленной смесью контаминируют изделия, полностью погружая в нее мелкие, а на крупные наносят пипеткой, следя за равномерным смачиванием всей поверхности. Каналы изделий заполняют с помощью шприца или другого приспособления, избегая образования пузырьков воздуха.

Разъемные изделия погружают в смесь и, опуская в нее, делают несколько рабочих движений. Инструменты, имеющие замковые части, погружают раскрытыми, предварительно сделав ими несколько рабочих движений для лучшего проникновения вируса в труднодоступные участки изделия в области замка. Избыток смеси удаляют любым способом (промокают с помощью стерильной фильтровальной бумаги, марлевой салфетки), но не протирают!! изделия. Тест-изделия подсушивают при температуре 20±2°С в течение 60-90 мин.

Определение активной концентрации средства и времени вирулицидного действия. Контаминированные вирусом изделия погружают в дезинфектант на время дезинфекционной выдержки (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 мин.) или, при необходимости на более

длительное время, например, 240 мин. – для изделий однократного применения перед утилизацией.

По истечении времени дезинфекционной выдержки изделия извлекают из дезинфектанта. Каналы промывают нейтрализатором, с поверхностей берут смывы салфетками размером 5х5 см, смоченными нейтрализатором. Салфетки, мелкие изделия погружают в пробирки с бусами и с нейтрализатором (объем – 5 мл), которые помещают в шуттель-аппарат на 10 мин.

Полученную смывную жидкость вносят в пробирки или лунки планшет с культурой клеток или вводят в организм лабораторного животного (или уток).

Оптимальное время обеззараживания – не более 60 мин., для изделий однократного применения – не более 240 мин.

1.6.4.1.2. Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов, включая дезинфекцию высокого уровня

В качестве исследуемых объектов используют гибкий (гастроскоп), жесткий (цистоскоп) эндоскопы или фрагменты гибкого эндоскопа (гастроскопа) – его каналов и наружной поверхности.

С помощью пипетки ВС контаминируют поверхность и каналы эндоскопа (или его фрагменты), затем их погружают в раствор ДС, заполняя им каналы изделия. Для имитации минимального органического загрязнения к ВС перед контаминацией тест-изделия добавляют 5% инактивированной сыворотки. Через 5-60 мин. тест-изделие извлекают из раствора и берут смыв с его поверхности стерильной марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора и оставляют на 10 мин.

Салфетки помещают в пробирки с нейтрализатором и стеклянными бусами, отмывают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. Промывную – из каналов и смывную – с салфеток жидкости вносят в культуру клеток (или заражают другой биологический объект), отмытую от ростовой среды, оставляют на контакт на 30-60 мин. для адсорбции вируса и добавляют поддерживающую среду. При необходимости для снятия цитотоксического действия ДС клетки промывают раствором Хенкса и заливают поддерживающей средой с сывороткой. Клетки инкубируют в термостате при необходимой для конкретного вируса температуре.

Оптимальное время обеззараживания – не более 60 мин.

При разработке режима дезинфекции высокого уровня в качестве органической нагрузки используют 5% инактивированной СКРС. ДС используют в концентрации, обеспечивающей стерилизацию, и исследует только время дезинфекции высокого уровня.

Оптимальное время ДВУ – не более 30 мин.

1.6.4.1.3 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания стоматологических оттисков

В качестве тест-объектов используют оттиски из альгинатных, силиконовых или других материалов. Для изготовления оттисков слепочную массу, полученную в соответствии с рекомендациями изготовителя, помещают в пластмассовую или металлическую ложку и делают оттиск с пластмассовых зубных протезов с моделированной десной.

На оттиски наносят вирусной суспензии, подсушивают в течение 2-3 мин., промывают стерильной водой и погружают полностью в раствор ДС. Контрольные контаминированные вирусной суспензией

оттиски погружают в стерильную водопроводную воду (вместо раствора ДС) на максимальное время, взятое в эксперименте.

Через 5-30 мин. оттиски извлекают из раствора ДС (контрольные – из воды) и делают смывы марлевой салфеткой, смоченной в 5 мл нейтрализатора, приготовленного на поддерживающей среде.

Салфетки помещают в пробирки с нейтрализатором и стеклянными бусами, отмывают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. Смывной жидкостью заражают культуру клеток (или другой биологический объект). Культуру клеток отмытую от ростовой среды, оставляют на контакт на 30-60 мин. для адсорбции вируса. Затем клетки промывают раствором Хенкса и заливают поддерживающей средой с сывороткой. Клетки инкубируют в термостате при оптимальной для конкретного вируса температуре.

Оптимальное время обеззараживания – не более 30 мин.

1.6.4.1.4 Особенности постановки экспериментов по изучению вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания изделий медицинского назначения в установках (моюще-дезинфицирующие машины и др.)

Одним из самых значимых условий постановки экспериментов по разработке (для отечественных) или экспертной оценке (для зарубежных) режимов обеззараживания изделий медицинского назначения в установках, например, ультразвуковых, моюще-дезинфицирующих машинах, является создание условий эксперимента, максимально приближенных к условиям практического применения (в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по эксплуатации).

Принципиальными являются следующие характеристики: скорость движения (циркуляции) дезинфицирующего раствора; температура раствора, количество (объем) раствора, диаметр канала (каналов) по которым

циркулирует раствор. Повышенная температура растворов ДС и принудительная циркуляция повышают их активность, в несколько раз сокращая время обеззараживания медицинских изделий.

1.6.4.2 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания предметов ухода за больными и игрушек.

Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании предметов ухода за больными.

Предметы ухода за больными можно поделить на 2 группы в зависимости от возможного загрязнения биосубстратами и степени контаминации вирусами:

1) наконечники к клизмам соприкасаются при их использовании со слизистой оболочкой прямой кишки, поэтому требования к их обработке и критерии эффективности ДС такие же, как к изделиям медицинского назначения. Органическая нагрузка в экспериментах должна составлять 40% сыворотки, а способ обеззараживания – путем погружения в раствор ДС.

2) подкладные клеенки могут быть загрязнены любыми выделениями, поэтому органическая нагрузка должна быть такая же, как и в экспериментах с изделиями медицинского назначения – 40%, а способ обеззараживания путем – погружения в раствор или одно-, при необходимости – двукратного протирания.

3) пузыри для льда и грелки соприкасаются только с кожей, они, как правило, не загрязнены выделениями, однако, могут быть контаминированы вирусами. При разработке режимов их обеззараживания органическая нагрузка на тест-объектах не обязательна, а способ обработки – одно- или двукратное протирание.

В качестве тест-объектов, имитирующих предметы ухода за больными, используют тест-поверхности размером 10х10 см, изготовленные из резиновых грелок, пузырей для льда, медицинской клеёнки, а также наконечники к клизмам и др., из разных материалов. Их контаминируют смесью вирусной суспензии с 40% инактивированной сыворотки. Наконечники к клизмам контаминируют вирусом по такой же методике, что и изделия медицинского назначения, имеющие каналы, затем подсушивают до полного высыхания при температуре 20±2°С.

Подготовленные тест-объекты протирают однократно или двукратно с интервалом 15 мин. салфеткой, смоченной раствором ДС. Кроме того, тест-объекты, изготовленные из медицинской клеёнки, погружают в дезинфицирующий раствор.

Мелкие предметы (наконечники к клизмам и др.) погружают в раствор ДС, заполняя им полости и каналы, избегая образования пузырьков воздуха.

Через 30, 60, 90, 120 мин. смывы берут марлевыми салфетками размером 5х5 см, смоченными в нейтрализаторе. Предметы ухода, имеющие каналы, промывают нейтрализатором (не более 5 мл), который собирают в стерильные пробирки и оставляют на 10 мин. для нейтрализации. Марлевые салфетки погружают в широкогорлые пробирки с бусами (с 5 мл нейтрализатора, приготовленного на поддерживающей среде), которые отмывают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. Далее – как в п. 2.1.1.4.

Оптимальное время обеззараживания предметов ухода за больными – не более 120 мин.

Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании игрушек.

При обеззараживании игрушек (мелких и средних) определение вирулицидной активности ДС проводят при обработке способами протирания, погружения в раствор ДС или орошения (для крупных игрушек).

С этой целью игрушки (без отверстий) контаминируют вирусной суспензией из расчета 0,5 мл на 100 $см^2$, но так, чтобы вся их поверхность была ею покрыта. Мелкие игрушки погружают полностью в вирусную суспензию. Затем их подсушивают при температуре 18-20°С до полного высыхания.

Поверхность игрушек протирают салфеткой, смоченной раствором ДС (в контроле – стерильной водой), мелкие игрушки погружают в раствор ДС, препятствуя их всплытию; крупные игрушки орошают раствором ДС. Норма расхода раствора ДС способом протирания 100-150 $мл/м^2$ при однократной обработке, способом орошения – 150 $мл/м^2$ при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 $мл/м^2$ – обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом. При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5-15 мин.

Через определенные интервалы времени (от 15 до 120 мин.) с помощью марлевой салфетки (5х5 см), смоченной нейтрализатором, приготовленном на поддерживающей среде или физрастворе, с игрушек берут смывы. Салфетки погружают в пробирки со стеклянными бусами и нейтрализатором. Далее – как в п. 2.1.1.4.

Оптимальное время обеззараживания – не более 120 мин.

1.6.4.3 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания белья, спецодежды и др. изделий из тканей

При определении вирулицидной активности ДС при обеззараживании белья учитывают соотношение раствора ДС и белья: при особо опасных инфекциях расход раствора составляет 5 л на 1 кг сухого белья, при прочих – 4 л раствора на 1 кг сухого белья; температуру раствора, степень и характер загрязнения белья.

Определение эффективности ДС при обеззараживании белья без видимых загрязнений. Исследования проводят с помощью батистовых тестов. Контаминированные вирусом тесты подсушивают при комнатной температуре, затем их закладывают (по 5 штук в каждый) в бязевые стерильные мешочки размером 5х8 см с пришитой к углу каждого из них прочной нитки длиной около 0,5 м. Мешочки закрывают в виде конверта.

Белье (старые бязевые халаты, полотенца и др.) погружают в емкость с раствором ДС, последовательно замачивая одну вещь за другой, следя за тем, чтобы между вещами не образовывалось воздушных прослоек, препятствующих процессу дезинфекции. Одновременно между слоями белья распределяют (сверху, в середине и внизу) мешочки с контаминированными вирусом тестами.

Через определенные промежутки времени (15-30-60 и более мин.) мешочки с тестами извлекают одновременно из трех слоев.

Тесты вынимают из мешочка стерильным пинцетом, погружают в широкогорлые пробирки с нейтрализатором и бусами, далее – как в п. 1.6.4.1.4.

Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании белья, загрязненного кровью, фекалиями. С целью изучения эффективности средства при обеззараживании белья, загрязненного кровью (имитация в виде 40% сыворотки), медицинских отходов из тканей, марли, ваты (одноразовое хирургическое белье и акушерские

комплекты, перевязочный материал, марлевые салфетки, ватные тампоны и др.) к 6 мл вируссодержащей жидкости прибавляют 4 мл инактивированной СКРС, смешивают и заливают тесты, подсушивают их и используют в опыте (п. 1.7.4.1.3.).

Оптимальное время обеззараживания белья – не более 120 мин., медицинских отходов – не более 240 мин.

Для имитации загрязнения белья и медицинских отходов из тканей и др. фекалиями в экспериментах с тест-вирусом используют фекальную эмульсию. Фекальную эмульсию готовят следующим образом: к 6 мл 10% ВС добавляют 4 мл 40% эмульсии фекалий. Для этого 8 г простерилизованных фекалий (1,5 атм. в течение 30 мин.) растирают в ступке с 20 мл стерильной воды. В качестве органической нагрузки можно использовать также 80% инактивированной СКРС из расчета: 8 мл сыворотки и 2 мл вирусной суспензии, тщательно перемешивают и этой смесью заливают тесты. Избыток жидкости через 15 мин. удаляют с помощью пипетки, тесты подсушивают при комнатной температуре. Далее эксперимент проводят по схеме для незагрязненного белья (п. 1.7.4.1.3.).

Оптимальное время обеззараживания белья и медицинских отходов, загрязненных фекалиями – не более 240 мин.

1.6.4.4 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды, в том числе лабораторной

Методика обеззараживания посуды без остатков пищи, а также без других видимых загрязнений.

При обеззараживании посуды без остатков пищи, лабораторной посуды без видимых загрязнений в качестве тест-объектов используют тарелки, стаканы, эмалированные кружки; столовые приборы – ножи,

вилки, ложки; лабораторной посуды – пипетки, в т.ч. микропипетки, наконечники к ним, предметные стекла, пробирки.

Чистую посуду контаминируют вирусной суспензией, которую наносят пипеткой из расчета 0,5 мл на 100 $см^2$ и равномерно распределяют по поверхности стерильным стеклянным шпателем. Вилки, ложки и ножи погружают в вирусную суспензию на 10-15 мин. (за исключением ручек), каналы пипеток контаминируют вирусом.

Посуду, столовые приборы подсушивают при комнатной температуре. После полного высыхания погружают в раствор ДС, полностью их покрывая (расход раствора составляет примерно 2 л на комплект посуды: чашка, блюдце, 2 тарелки, ложка, вилка, нож) раствором.

Через определенные интервалы времени (15, 30, 60, 90, 120 мин.) посуду извлекают из раствора ДС. Для оценки эффективности обеззараживания стерильными марлевыми салфетками размером 5х5 см (вначале увлажненной нейтрализатором, затем сухой) тщательно протирают контаминированные вирусом части каждого предмета. Салфетки помещают в стерильную широкую пробирку с бусами и с 5 мл стерильного нейтрализатора (п. 1.6.4.1.4.).

Оптимальное время обеззараживания – не более 60 мин.

Контролем служит аналогичным способом контаминированная вирусом посуда, погруженная на максимальную экспозицию в стерильную или прокипяченную водопроводную воду.

Методика обеззараживания посуды с остатками пищи, а также загрязненной лабораторной посуды. Для изучения эффективности ДС при обеззараживании посуды с остатками пищи, загрязненной лабораторной посуды многократного использования и однократного применения (перед утилизацией) к вирусной суспензии добавляют 80%

инактивированной СКРС из расчета: 20% вирусной суспензии и 80% сыворотки, смесь наносят равномерно на посуду, подсушивают. Далее – как в п. 2.4.1.

Оптимальное время обеззараживания – не более 120 мин. для посуды многократного использования и не более 240 мин. – для посуды однократного применения (перед утилизацией).

1.6.4.5 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей

Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании тест-поверхностей изучают двумя способами: способом протирания (одно- или двукратного) или способом орошения.

В экспериментах используют тест-поверхности размером 10х10 см, гладкие, шероховатые, впитывающие и невпитывающие ДС из различных материалов: деревянные, оштукатуренные, окрашенные масляной или клеевой и др. красками, оклеенные обоями, а также из линолеума, пластика, стекла, кафеля, метлахской плитки, фаянса, искусственной или натуральной кожи и др. Набор тест-поверхностей (далее - «поверхности») определяется назначением средства.

Перед экспериментом поверхности подвергают механической очистке – моют водой с мылом и щеткой, за исключением поверхностей, оклеенных обоями и окрашенных клеевой краской. Последние протирают несколько раз стерильной салфеткой, увлажненной стерильной водопроводной водой. После подсыхания поверхности располагают горизонтально и пипеткой наносят вирусной суспензией из расчета 0,5 мл с добавлением 5% инктивированной СКРС на площадь в 100 $см^2$, равномерно распределяют по поверхности стеклянным шпателем. Контаминированные вирусом поверхности

подсушивают до полного высыхания при температуре 20±2°С и относительной влажности воздуха 50-60%, затем обрабатывают раствором ДС.

При обеззараживании контаминированных ВС поверхностей некоторых видов – оштукатуренные, окрашенные клеевой и др. красками, оклеенные обоями, из стекла, фаянса, дерева, окрашенного масляной краской, из кафеля, располагают вертикально и проводят обработку в этом положении (способ орошения). Остальные поверхности обрабатывают как в горизонтальном (способ однократного или двукратного протирания), так и в вертикальном положениях. Раствор ДС наносят на поверхность путем орошения из пульверизатора, точно следя за количеством израсходованной жидкости. Норма расхода – от 80 до 500 мл раствора на 1 $м^2$ обрабатываемой площади.

Для имитации органического загрязнения используют 40% инактивированной сыворотки при разработке режимов обеззараживания раковин, ванн или при разработке режимов обеззараживания унитазов – 80%. Возможно также использование вируссодержащей фекальной эмульсии, которую наносят на поверхности из кафеля или фаянса в экспериментах с вирусами, выделяющимися из организма с фекалиями.

Контроль эффективности обеззараживания осуществляют через 15-30-60 мин. Пробы отбирают путем тщательного протирания орошенных раствором ДС поверхностей слегка увлажненной нейтрализатором в физиологическом растворе или растворе Хенкса с антибиотиками стерильной марлевой салфеткой (5х5 см), а затем сухой. Салфетки помещают в широкогорлые пробирки с бусами с 5 мл нейтрализатора (п. 1.6.4.1.4.).

Оптимальное время обеззараживания поверхностей – не более 60 мин.

В контроле вируса контаминированные ВС поверхности протирают или орошают стерильной или прокипяченной водопроводной водой при той же норме расхода воды, что и ДС в опыте. Забор проб и их обработку проводят аналогично опытным. Для определения плотности контаминации проводят титрование смывов с поверхностей.

При работе с вирусом гепатита А опыт моделируется с меньшим количеством белья, ДС и вирусной суспензии.

1.6.4.6 Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, фекалии, мокрота) и крови

При определении вирулицидной активности ДС для обеззараживании мочи подбирают концентрацию ДС и время обработки. Растворы ДС добавляют к продезинфицированной способом кипячения моче в равном или двойном объеме. Через 15, 30, 60 мин. указанную смесь в количестве 1 мл переносят в пробирки с 5 мл нейтрализатора, перемешивают, оставляют на 10 мин. для нейтрализации, затем заражают культуру клеток (или другой биологический объект). Культуру клеток, отмытую от ростовой среды, оставляют на контакт на 30-60 мин. для адсорбции вируса. Затем клетки промывают раствором Хенкса и заливают поддерживающей средой с сывороткой. Клетки инкубируют в термостате при оптимальной для конкретного вируса температуре.

В контроле к моче добавляют не дезинфицирующий раствор, а стерильную воду. Результаты опытов учитывают в сравнении с контролем. Количество вируса в моче в контроле определяют титрованием.

Оптимальное время обеззараживания – не более 120 мин.

При разработке режимов обеззараживания фекалий учитывают соотношение ДС и обеззараживаемой массы фекалий, время обработки, консистенцию обеззараживаемых выделений, степень гомогенизации в процессе обеззараживания.

С этой целью 20 г простерилизованных фекалий растирают в ступке с добавлением 80 мл воды до получения гомогенной эмульсии. Эмульсию разливают по 9 мл в пробирки и добавляют по 1 мл вируссодержащей жидкости.

Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным количеством раствора ДС и в дальнейшем берут пробы так же, как и при обеззараживании мочи. Взятые пробы центрифугируют при 2500-3000 об./мин. в течение 20 мин., после чего надосадочной жидкостью заражают культуру клеток, внося её в пробирки/лунки с клетками, или в организм чувствительного животного, уток.

В контроле вместо раствора ДС используют стерильную воду. Результаты учитывают в сравнении с контролем.

Оптимальное время обеззараживания – не более 240 мин.

При разработке режимов обеззараживания крови (без сгустков) используют цитратную (или дефибринированную) кровь, контаминированную тест-вирусом (соотношение объема крови и вирусной суспензии 1:1). Можно также использовать эритроцитарную массу (бараньи эритроциты), которая готовится путем добавления к 3 мл отмытой эритроцитарной массы 97 мл 3,0% раствора альбумина на фосфатном буфере. Аликвоты этой смеси контаминируют тест-вирусом. Подбирают оптимальное соотношение ДС и обеззараживаемой крови, концентрацию ДС, время обработки, нейтрализуют (1:1, то есть 1 объем смеси крови и ДС и 1 объем нейтрализатора) выдерживают 5-10 мин. (перемешивая или встряхивая) и используют для определения

инфекционности тест-вируса. Для обеззараживания крови со сгустками эффективным является только термический метод обработки (в паровом стерилизаторе).

Оптимальное время обеззараживания – не более 240 мин.

При разработке режимов обеззараживания мокроты используют мокроту волонтеров, подбирают оптимальное соотношение ДС и обеззараживаемой мокроты, время обработки, концентрацию ДС, нейтрализатор.

Оптимальное время обеззараживания – не более 240 мин.

1.6.4.7. Определение вирулицидной активности аэрозолей ДС, предназначенных для обеззараживания воздуха в помещениях

Для определения вирулицидной активности аэрозолей ДС при обеззараживании воздуха в помещениях (инфекционные очаги, лечебно-профилактические учреждения и др.) применяют аспирационный метод.

В качестве тест-вирусов используют полиовирус и/или аденовирус. ВС распыляют в камере в количестве, достаточном для получения в воздухе камеры концентрации вируса $1x10^5$ $ТЦИД_{50}/м^3$. Аэрозоль создают с помощью распыливающей аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80% частиц с дисперсностью 20+5 мкм, затем включают вентилятор для предотвращения оседания аэрозоля ДС.

В склянки Дрекселя вместо 50 мл стерильной водопроводной воды наливают 5 мл раствора Хенкса или поддерживающей питательной среды с нейтрализатором и антибиотиками.

Для контроля исходной контаминации воздуха вирусом перед началом эксперимента через склянки Дрекселя, соединенные последовательно одна с другой, а также в процессе эксперимента

пропускают по 50 л воздуха (объем пробы для исследования). После отбора проб через каждые 5, 10 или 15 мин., в зависимости от предполагаемой эффективности ДС и с учетом чувствительности вируса к ДВ, жидкость из двух склянок Дрекселя соединяют, перемешивают и по 2 мл вносят в пробирки/лунки с культурой клеток (или в организм лабораторного животного, уток). Клетки оставляют на 1 час для контакта, затем сливают. После этого во все пробирки вносят поддерживающую среду в количестве 2 мл и помещают в термостат.

При определении эффективности аэрозоля ДС исследования проводят при трех показателях относительной влажности воздуха: 20-25%, 50-55% и 80-85% и температуре воздуха 20±2°С. Во время эксперимента в камере должен постоянно работать вентилятор для перемешивания компонентов исследуемой системы – вируса, воздуха, аэрозоля ДС.

Об инактивации вируса судят по утрате им инфекционной активности.

Вирулицидная активность ДС в форме аэрозоля зависит от концентрации вируса в воздухе, расхода смеси аэрозоля на единицу объема, концентрации раствора ДС в аэрозольной смеси, экспозиции, относительной влажности воздуха и температуры в камере.

В контроле используют аэрозольные смеси, содержащие вместо раствора ДС стерильную воду, которые распыляют в камере в тех же количествах, при этом размер аэрозольных частиц должен быть одинаковым с размером частиц аэрозоля средства.

1.6.4.8. Определение вирулицидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов

Методики определения вирулицидной активности ДС при обеззараживании медицинских отходов разного происхождения приведены в соответствующих разделах – изделий медицинского назначения однократного применения (п. 1.7.4.1.1.); отходов из тканей (медицинская защитная одежда и белье, перевязочный материал, марлевые салфетки, ватные тампоны и др.) (п .1.7.4.3.); посуды, в том числе лабораторной однократного использования (п. 1.7.4.4.); крови и др. (п. 1.7.4.6.).

1.6.5. Определение вирулицидной активности антимикробных тканей, лакокрасочных материалов

При определении вирулицидной активности антимикробных тканей выбор тест-вируса и тест-объекта зависит назначения и сферы применения, например, марлевые повязки для защиты верхних дыхательных путей профессионального контингента (медицинские работники, продавцы в супермаркетах и др.) или изготовление спецодежды и пр.

С этой целью на тест-объекты (по два на каждое разведение) из исследуемой ткани размером 2х2 см капельно наносят по 0,05 мл вирусной суспензии. Через 30 сек., 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 мин. тест-объекты переносят в широкогорлые пробирки с бусами и с 5 мл нейтрализатора, отмывают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. Смывной жидкостью заражают культуру клеток (или другой биологический объект). Культуру клеток, отмытую от ростовой среды, оставляют на контакт на 30-60 мин. для адсорбции вируса. Затем клетки промывают раствором Хенкса и заливают поддерживающей средой с сывороткой. Клетки инкубируют в термостате при оптимальной для

конкретного вируса температуре. В контроле используют тест-объекты из ткани того же артикула, но не содержащей противовирусных веществ.

Критерии вирулицидной активности – снижение титра вируса не менее, чем на 4 $\log_{10}$.

Определение вирулицидной активности лакокрасочных материалов. При определении вирулицидной активности лакокрасочных материалов (антимикробные лаки, краски) вирусную суспензию в дозе 10^5 $ТЦИД_{50}$/мл наносят в количестве 0,5 мл на исследуемую тест-поверхность (размер 10х10 см). После необходимой экспозиции (от 30 мин. до 24 часов) с поверхности берут смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором. Салфетки погружают в широкогорлые пробирки с 5 мл нейтрализатора и бусами, отмывают в течение 10 мин. в шуттель-аппарате (п. 1.7.4.1.4.).

В качестве контроля используют тест-поверхности, окрашенные краской или покрытые лаком, не содержащими вирулицидных веществ.

Определение пролонгированного вирулицидного действия лакокрасочных материалов проводят на тест-поверхностях без дополнительной и с дополнительной искусственной контаминацией испытуемым тест-вирусом.

Критерии вирулицидной активности лакокрасочного покрытия – снижение количества вируса не менее, чем на 4 $\log_{10}$ через 24 часа после нанесения его на поверхность; наблюдение может продолжаться в течение 6 месяцев и более.

1.6.6 Приложения

Приложение 1. (рекомендуемое)

1. Тест-вирусы и методы их культивирования

1.1. Тест-вирусы

Тест-вирусы получают из национальных или из международных коллекций вирусов:

1.1.1. Вирус полиомиелита 1 типа (вакцинный штамм Sabin (LSc-2ab), РНК-содержащий вирус, не имеющий оболочки, из семейства пикорнавирусов;

1.1.2. Аденовирус, тип 5, штамм Аденоид 75 (ATCC VR-5), ДНК-содержащий вирус, не имеющий оболочки, из семейства аденовирусов;

1.1.3. Бычий парвовирус, штамм Хаден (ATCC VR-767);

1.1.4 Вирус гепатита А, штамм HAS-15, РНК-содержащий вирус, не имеющий оболочки, из семейства пикорнавирусов;

1.1.5 Вирус гепатита В уток (ВГВУ), штамм «УФА–04», ДНК-содержащий, из семейства гепаднавирусов;

1.1.6. Вирус гепатита С человека, штамм Д1;

1.1.7 Вирус бычьей диареи (ВД-БС), РНК-содержащий вирус диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, из семейства пестивирусов, штамм ВК-1В1-№28.

1.2. Культивирование вирусов

1.2.1. «Исходный вирус» – это вирус, полученный из референс центров (из национальных или международных коллекций вирусов), размноженный в объемах, достаточных для длительной работы с данным пассажем, при минимальных количествах пассажей. Хранится

в малых объемах при -70°С или в жидком азоте (Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита, ВОЗ, Женева, М., 1998).

1.2.2. «Тест-вирусная суспензия» – вирусная суспензия, полученная из исходного вируса и используемая для определения вирулицидных свойств дезинфектанта.

1.2.3. Исходный вирус размножают в чувствительных клетках (лабораторных животных, утках и др.), продуцирующих вирус в высоких титрах. Клеточный детрит удаляют цетрифугированием при низких оборотах (1000 об./5 мин.). Этот материал называют «тест-вирусной суспензией». Ее используют не разведенной.

Предполагается, что минимальный титр вирусной суспензии по крайней мере 106,5 $ТЦИД_5$0/мл. В любом случае он должен быть достаточно высоким, чтобы можно было получить снижение титра на 4,0 $\log_{10}$.

Полиовирус размножают в перевиваемой культуре клеток RD и НЕр-2 или в других чувствительных клеточных культурах (4647, Vero и т.д.). Для получения ВС культуру клеток, инфицированную вирусом полиомиелита на стадии 100% поражения монослоя, вызванного цитопатическим действием вируса, трехкратно замораживают и оттаивают. После удаления разрушенных клеток центрифугированием, полученную суспензию используют в экспериментах.

Аденовирус размножают в перевиваемой клеточной культуре НЕр-2, 4647 и в других чувствительных клеточных культурах. Методика получения ВС аналогична вышеописанной, за исключением того, что перед процедурой разрушения клеток методом замораживания-оттаивания, проводят замену культуральной среды на не содержащую сыворотки и добавляют ее в меньшем объеме.

Вирус гепатита А размножают в перевиваемой культуре клеток 4647. Для получения вирусной суспензии флаконы инкубируют при 37°С в течение 21-28 дней с еженедельной сменой среды. По окончании инкубации из флаконов удаляют среду поддержания, монослой промывают раствором Хенкса, добавляют подогретый до 37°С раствор Версена, монослой обмывают диспергентом, раствор Версена сливают и добавляют 0,1М фосфатно-солевой буфер, рН 7,6.

Зараженные клетки ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере, суспензию клеток пятикратно замораживают (-70°С) и оттаивают при комнатной температуре. Полученный клеточный лизат, содержащий 6,5-7,0 $\log_{10}$ вирус гепатита А гомогенизируют и осветляют центрифугированием (3000 об./5 мин.), затем используют в качестве тест-вируса.

Супернатант аттестовывают на содержание антигена вирусного гепатита А методом иммуноферментного анализа. Оптическая плотность (ОП450) испытуемых образцов, обработанных ДС, должна соответствовать ОП450 контрольных образцов, не содержащих вирус гепатита А.

Методика определения инфекционного титра основана на выявлении антигена вируса гепатита А при титровании методом конечного разведения. Готовят 10-кратные разведения анализируемого материала на среде Игла МЕМ х 2. Каждым разведением вируса, начиная 10^3 заражают не менее 4 одинаковых емкостей с плотным монослоем культуры клеток 4647. После инкубации в течение 21-28 дней. Супернатант аттестуют на содержание вирусного антигена методом иммуноферментного анализа. Инфекционные титры вычисляют по методу Рида и Менча или по методу Спермана-Кербера (Приложение 3).

Вирус гепатита В уток Метод моделирования инфекции ВГВУ in vivo.

Источником вируса при моделировании инфекции является сыворотка крови домашней утки, инфицированной ВГВУ in vivo при экспериментальном заражении вирусом с известными инфекционными свойствами. Для тест-вируса ВГВУ, используемого в каждом опыте по оценке ДС, должен быть определен инфекционный титр.

Важным моментом при подготовке опыта по испытанию ДС с помощью моделирования ВГВУ-инфекции домашних уток является определение численности опытных групп. По причине довольно широкой распространенности естественной ВГВУ-инфекции и отсутствия скрининга на ВГВУ в хозяйствах-поставщиках эмбрионов и утят на территории Российской Федерации перед закладкой опыта необходимо предварительное тестирование на ДНК ВГВУ для отвода от участия в опыте уток с естественной инфекцией. Ввиду максимальной восприимчивости к инфицированию ВГВУ утят в возрасте 1-3 дней целесообразно работать с утятами именно этого возраста, однако предварительный скрининг может привести к задержке эксперимента, и, как следствие, к снижению числа восприимчивых к инфицированию особей. Поэтому рекомендуется увеличение опытных групп до 10-15 голов каждая с учетом потенциального числа утят с естественной ВГВУ-инфекцией, взятие крови у всех утят непосредственно перед введением опытного материала, определение ДНК ВГВУ в течение ближайшего времени и выведение из опыта утят с выявленной естественной ВГВУ-инфекцией.

После определения числа опытных групп проводят непосредственно обработку вируса ДС. Обработка ДС должна проводиться непосредственно перед введением материала уткам, при

необходимости обработанный ДС вирусный препарат может храниться не более суток при +4°С без снижения потенциальных инфекционных свойств.

Обработка вируса ДС проводится по стандартной методике, с использованием суспензионного метода или метода батистовых тест-объектов.

Затем проводят нейтрализацию ДС по стандартной методике. Трехдневных утят размещают по 10 голов в изолированных клетках по числу групп эксперимента. Затем у всех утят берут кровь, и используют для последующего ПЦР-анализа. После взятия крови уткам внутрибрюшинно вводят материал, полученный в результате обработки ВГВУ ДС. Показано, что внутрибрюшинное инфицирование ВГВУ так же эффективно, как и внутривенное, но при этом менее травматично для животных. Каждой утке вводят 200 мкл материала, в каждой опытной группе используют соответствующий материал, обработанный выбранной концентрацией ДС. В позитивной и негативной группах таким же образом вводят соответствующий контрольный материал.

После получения данных по выявлению естественной ВГВУ-инфекции среди задействованных в эксперименте уток, позитивных по ВГВУ особей удаляют. У всех участвующих в эксперименте уток проводят взятие крови через 3 недели после инфицирования. Взятие крови и отделение сыворотки крови проводят таким же образом, как и при предварительном тестировании на естественную ВГВУ-инфекцию. В отобранных образцах проводят определение ВГВУ-инфекции в ПЦР. Оценка результатов эксперимента проводится по системе «да/нет», то есть появление даже одного случая ВГВУ-инфекции в опытной группе рассматривается как инфицирование ВГВУ, и, как следствие, указывает

на недостаточные вирулицидные свойства анализируемой концентрации ДС.

Вирус диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота размножают в клетках КСТ – перевиваемой культуре клеток коронарных сосудов сердца плода коровы. Вирус имеется в музее ГУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко».

Вирус гепатита С человека размножают в культуре клеток по методике, разработанной в ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Приложение 2. (справочное)

Статистическая обработка результатов

А. Определение 50% дозы по методу Рида и Менча и по методу Спермана-Кербера

Титрование вируса в пробирочных культурах и на животных предусматривает определение дозы, при которой действие вируса (цитопатогенный эффект или гибель животных) проявляется в 50% тест-объектов (пробирочных культур или животных), так называемых $ТЦИД_{50}$ или LD50. Поскольку в большинстве случаев по данным титрования сразу не удается определить 50% дозу, возникает необходимость в статистической обработке результатов. Результаты могут считаться статистически достоверными при соблюдении следующих условий:

количество тест-объектов, зараженных одним разведением вируса, должно быть не менее 4;

в титрование должны быть включены два разведения вируса ниже 50% дозы и два разведения вируса выше этой дозы.

Среди различных методов подсчета ТЦИД50 или LD50 наибольшее распространение получили метод полных кумулятивов Рида и Менча и метод определения «центральной величины» Кербера.

1. Метод Рида и Менча (Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating 50% endpoints. Am. J. Hyd., 1938, 27, 493-497. Упрощенный вариант по книге Ворошиловой М.К., Жевандеровой В.И., Балаяна М.С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. М., Медицина, 1964. – с. 127-129. Статистическая обработка результатов).

Метод основан на логической предпосылке, что тканевая культура или животное, погибшие при заражении их каким-либо разведением вируса, погибнут и при заражении любым более низким разведением.

Пример подсчета показан в табл. 1.

Таблица 1

Подсчет 50 % дозы ($ТЦИД_{50}$) по методу Рида и Менча

Разведение вируса	Количество тест-	Исходные		Кумулятивные			Процент гибели
		погибло	выжило	погибло		выжило	
10^{-5}	4	4	0		7	0	100
10^{-6}	4	2	2		3	2	60
10^{-7}	4	1	3		1	5	17
10^{-8}	4	0	4		0	9	0

Из Таблицы 1 видно, что 50% доза находится между разведениями вируса 10^{-6} и 10^{-7}.

Далее расчет величины X, которую необходимо прибавить к разведению непосредственно ниже 50% дозы (в $\log_{10}$), производится по следующей формуле:

$$X = \frac{A-50}{A-B}, \qquad (1)$$

где:

А – процент гибели при разведении, непосредственно ниже искомой 50% дозы (в данном случае 60%);

В – процент гибели при разведении непосредственно выше искомой 50% дозы (в данном случае 17%).

Подставляя полученные значения в формулу 1, находим:

$$X = \frac{60 - 50}{60 - 17} = 0{,}23,$$

откуда титр вируса (в обратных $\log_{10}$) равен 6+0,23 = 6,23; другими словами, одна $ТЦИД_{50}$ или LD_{50} соответствует разведению вируса $10^{-6{,}23}$.

Если в титрование были взяты разведения вируса с интервалом 0,5 $\log_{10}$, то величину X в формуле 1 следует умножить на 0,5.

Поскольку при титровании вируса в пробирочных культурах обычно получаются четкие результаты и культуры со 100% дегенерацией отделены от культур с полным отсутствием дегенерации всего одним разведением вируса, удобно пользоваться при подсчете титров по Риду и Менчу упрощенной схемой:

Количество пробирочных культур, зараженных разведением 10^{-n}	Количество культур с ЦПЭ	Процент культур с ЦПЭ	Титр вируса в $\log_{10}$
4	1	25	(n-1), 66
4	2	50	n, 0
4	3	75	n, 33
4	4	100	n, 50

для вычисления $ТЦИД_{50}$ (количества цитопатогенных доз) вируса в 1 мл исследуемой жидкости к показателю величины титра вируса в $\log_{10}$ прибавляют в зависимости от количества вируссодержащего

материала, взятого для заражения одной культуры, соответствующие величины поправок:

Объем материала в миллилитрах, взятого для заражения одной культуры	Величина поправки в единицах логарифма
0,2	0,7
0.25	0.6
0.3	0.52
0.4	0.4
0.5	0.3
0.6	0.22
0.7	0.16
0,8	0,1

Например, если во всех пробирочных культурах, зараженных по 0,2 мл материалом в разведении 10^{-4}, наблюдается цитопатогенный эффект, а в культурах, инокулированных разведением 10^{-6}, цитопатогенного эффекта не наблюдается (при инокуляции же разведением 10^{-5} цитопатогенный эффект отмечен в одной из четырех пробирок), то титр вируса в $\log_{10}$ будет равен 104,66. Содержание же его в 1 мл будет равно 105,36 $ТЦИД_{50}$

2.Определение $ТЦИД_{50}$ вируса по методу Спермана-Кербера

$ТЦИД_{50}$ представляет собой отрицательный десятичный логарифм наибольшей использованной концентрации вируса, умноженной на логарифм разведения, то есть (сумма % пораженных клеток в каждом разведении (100 – 0,5) x log10 разведения.

Таблица 2

Пример результата титрования

Разведения , $-\log_{10}$	Результаты по ЦПД*	Процент (%) культур с наличием ЦПД

- 4	4, 4, 4, 4, 4, 4	100
- 5	4, 4, 3, 4, 4, 4	100
- 6	4, 4, 3, 3, 0, 0	66,7
- 7	4, 2, 0, 0 , 0, 0	33,3
- 8	0, 0, 0, 0, 0, 0	0
Сумма % с ЦПД		300

Примечание : *) – от 1 до 4 – плюсовая система %-го выражения гибели клеточных культур (1+ = 25%, 2+ = 50 %, 3+ = 75% и 4+ = 100%), 0 = отсутствие ЦПД.

Формула расчета $ТЦИД_{50}$ по этим данным:

-4 - [{(100+100+66,7+33,3+0)/100} – 0,5] x 1 = -4 – [300/100-0,5]x 1= -4 – 2,5 = 6,5.

Таким образом, $ТЦИД_{50}$ будет равно $10^{-6,5}$ или 6,5 $\log^{10}$ $ТЦИД_{50}$

3. Метод бляшек

Для расчета среднего значения количества бляшек используется следующая формула :

$$БОЕ/t = \frac{\Sigma c_1 + c_2 .... c_n}{n_1 + n_2 \; x \; v_2 + \ldots \; n_n \; x \; v_n \;) \; x \; d}$$

Где:

t – объем, добавляемый в лунку при каждом шаге разведения;

c_1 – число БОЕ во всех лунках наименьшего разведении, при котором возможен учет (уже не сливные бляшки);

c_2 - число БОЕ во всех лунках следующего разведения;

c_n – число БОЕ во всех лунках последнего разведения;

n_1 – количество всех лунок наименьшего разведения с не сливными бляшками (соответствует C_1);

n_2 – число всех лунок второго разведения с не сливными бляшками (C_2);

v_2 – фактор разведения между n1/ n2 (например, $n_1 = 10^{-3}$ и $n_2 = 10^{-4}$, то $v_2 = 0,1$);

n_n – количество всех лунок последнего разведения, при котором имеется бляшки (c_n);

v_n – фактор разведения между n_1 и n_n (например, $n_1 = 10^{-3}$ и $n_n = 10^{-6}$, то $v_n = 0,0001$);

d – шаг разведения c_1.

Вычисления проводятся с целыми числами, если последнее число меньше 5, то оно остается неизменным; если оно больше 5, то округляется до следующего целого числа.

Пример.

$$\text{БОЕ/t} \quad \frac{(52+48+49)+ (25+27+31)+5+6+7)}{[3+(3x\ 0,1)+ (3\ x\ 0,01)]\ x\ 10^{-3}} = \frac{250}{3,33x\ 10^{-3}} = 75075,075 = \lg 4,875 = \lg 4,9$$

Если объем, добавляемый при разведении, равен 0,2 мл, то БОЕ\мл $= \log_{10} 5, 6$.

1.7 Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств

1.7.1 Общие положения

Исследования спороцидной активности субстанций, ДС, стерилизующих средств (далее – СС) и эффективности режимов их применения включают:

выбор и подготовку тест-микроорганизмов в споровой форме для изучения спороцидной активности ДС, СС и их субстанций;

обеспечение стандартности условий проведения исследований спороцидной активности ДС, СС и их субстанций;

методы исследований и оценку результатов спороцидной активности ДС, СС и их субстанций in vitro (суспензионный метод, метод батистовых тест-объектов) и спектра спороцидной активности;

методы исследований и оценку спороцидной эффективности ДС при разработке режимов обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме;

методы исследований спороцидной эффективности СС при разработке режимов стерилизации ИМН, включая эндоскопы;

методы исследований спороцидной активности СС, предназначенных для ДВУ эндоскопов.

1.7.1.1 Тест-микроорганизмы для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций. Требования к тест-микроорганизмам.

При изучении спороцидной активности ДС и их субстанций в качестве тест-микроорганизмов используют:

Bacillus cereus, штамм 96;

Bacillus subtilis, штамм 7;

сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей;

Bacillus anthracis, штамм 81/1 (pX01+, pX02+), или штамм 27 (pX01+, pX02+).

При изучении спороцидной активности СС и их субстанций в качестве тест-микроорганизмов используют:

Bacillus cereus, штамм 96;

Bacillus subtilis, штамм 7;

Bacillus licheniformis, штамм G ВКМ B-1711D;

Geobacillis stearothermophilius, штамм ВКМ B-718.

Тест-микроорганизмы выбирают в зависимости от действующего вещества и от назначения спороцидного ДС, СС и его субстанции.

Требования к тест-микроорганизмам.

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические свойства, присущие данному виду (см. Приложение 1), и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС и СС: хлорамину 10%, перекиси водорода 6%, глутаровому альдегиду 2,5% (pH 7,2), сухому горячему воздуху при 160±3°С, водяному текучему пару при 100°С, водяному насыщенному пару под избыточным давлением при 121±1°С.

Показатели устойчивости тест-микроорганизмов к вышеперечисленным средствам приведены в таблице 5.8.

Музейные штаммы тест-микроорганизмов хранят в холодильнике при температуре 6±2°С в виде сухой культуры в ампулах (после лиофильной сушки) не более 2 лет или при температуре минус 70°С.

Рабочие культуры хранят на скошенном пшеничном агаре в холодильнике при температуре 6±2°С.

Тест-микроорганизмы, не обладающие указанной устойчивостью, подлежат замене.

Спороцидную активность ДС, СС и их субстанций определяют, используя тест-микроорганизмы в споровой форме.

Таблица 5.8.

Устойчивость спор тест-микроорганизмов к эталонным дезинфицирующим и стерилизующим средствам

Тест-культура		Время гибели тест-микроорганизмов, не менее (мин), при действии					
Название и штаммамм	к-во спор в тест-объекте	хлорамина 10 %	перекиси водорода 6 %	глутарового альдегида 2,5%	сухого горячего воздуха (160±3) °С)	водяного текучего пара (100 °С)	водяного насыщенного пара под избыточным давлением (121±1) °С)
Тест-микроорганизмы для изучения и оценки дезинфицирующих средств и их субстанций							
Bacillus cereus, штамм. 96	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	60	-	6-7	-
Bacillus subtilis, штамм. 7	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	180		6-7	-
Сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	60	-	6-7	-
Bacillus anthracis, штамм. 81/1 или 27	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	60	-	6-7	-
Тест-микроорганизмы для изучения и оценки стерилизующих средств и их субстанций							
Bacillus cereus, штамм. 96	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	60	-	6-7	-
Bacillus subtilis, штамм. 7	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	360	60	180	-	6-7	-
Bacillus licheniformis G ВКМ В-1711D	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	-	-	-	30	-	-
Geobacillis stearothermophilius, штамм. ВКМ В-718	$(1\text{-}5)\cdot10^6$	-	-	-	-	-	15

Использование *B. cereus* и *B. subtilis* в качестве тест-микроорганизмов при изучении спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств гармонизировано с Европейским стандартом. Руководствуясь данными таблицы 5.8. дальнейшие исследования проводят с использованием наиболее устойчивого тест-микроорганизма к проверяемому средству.

1.7.1.2. Методика приготовления суспензии спор тест-микроорганизмов

Для получения тест-микроорганизмов в споровой форме их выращивают на питательных средах, приведенных в Таблице 5.9.

Таблица 5.9.

Питательные среды для выращивания тест-микроорганизмов в споровой форме

№ п/п	Тест-культуры	Питательные среды
1.	Bacillus cereus, штамм. 96	Пшеничный агар
2.	Bacillus subtilis, штамм. 7	
3.	Bacillus anthracis, штамм. 81/1, 27	Пшеничный агар или агар Хоттингера с аминным азотом 120 мг%
4.	Bacillus licheniformis, G ВКМ B-1711D	Пшеничный агар или картофельно-пептонный агар
5.	Geobacillis stearothermophilius, штамм. ВКМ B-718	

Перечень компонентов и методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микроорганизмов, предназначенных для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций, приведены в Приложении 2.

Процесс приготовления суспензии спор тест-микроорганизма, используемого при исследовании и оценке спороцидной активности ДС, СС и их субстанций, включает три последовательных этапа:

1) получение бульонной культуры из музейной лиофилизированной или агаровой культуры тест-микроорганизма;

2) получение споровой агаровой культуры тест-микроорганизма;

3) приготовление суспензии спор тест-микроорганизма и оценка соответствия ее требованиям.

При использовании лиофилизированной споровой культуры B. cereus и B. subtilis ампулы с этими тест-микроорганизмами вскрывают в асептических условиях следующим образом: тампоном

ваты, смоченным этиловым спиртом, обрабатывают поверхность ампулы, затем нагревают ее запаянный конец над пламенем. К накаленному концу ампулы прикладывают ватную пробку, смоченную стерильной водой, чтобы на ампуле образовалась трещина. Металлическим инструментом (скальпель, пинцет) откалывают по трещине конец ампулы. После этого стерильной пастеровской пипеткой в ампулу вливают 0,2 мл стерильной питьевой воды, накрывают стерильной марлевой салфеткой и оставляют на 30 мин. при комнатной температуре. Для получения суспензии спор содержимое ампулы перемешивают с помощью стерильной бактериологической петли.

Полученную таким образом в ампуле суспензию спор тест-микроорганизма отсасывают стерильной пастеровской пипеткой и переносят по 1-2 капли в две пробирки с 5 мл питательного бульона (бульон Хоттингера, сухой питательный бульон - СПБ, мясо-пептонный бульон МПБ), содержащего 0,5 % глюкозы.

При работе с возбудителем сибирской язвы для приготовления суспензии спор ампулы с высушенными культурами вскрывают в помещении музея (коллекции) живых культур. Манипуляции проводят в боксе биологической безопасности. При этом оттянутый конец ампулы нагревают над пламенем газовой горелки; затем влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором и хорошо отжатой, и обламывают пинцетом.

После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение одной – двух мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезинфицирующий раствор. Вскрытую ампулу накрывают стерильным марлевым тампоном на 1-2 мин. Затем в

ампулу вносят 0,2 мл стерильной питьевой воды для приготовления суспензии спор, которую далее высевают в жидкие питательные среды, как указано выше.

Посевы G. stearothermophilius инкубируют при температуре 55±1°С, B. cereus, B. subtilis, B. anthracis и B. licheniformis – при температуре 37±1°С в течение 24-48 ч.

Бульонные культуры тест-микроорганизмов бактериологической петлей или пастеровской пипеткой (по 1-2 капли) пересевают в пробирки на скошенную питательную среду (сухой питательный агар – СПА, мясо-пептонный агар – МПА). Посевы инкубируют в течение 24-48 часов, как указано выше.

Для получения спор культур B. licheniformis, G. stearothermophilius в пробирки с посевом необходимого для проведения исследования тест-микроорганизма добавляют 5 мл стерильной дистиллированной воды и смывают культуру, выросшую на твердой питательной среде. Полученную взвесь переносят во флаконы или емкости до 250/500 мл, содержащие соответственно 100/200 мл соответствующего для данного тест-микроорганизма скошенной твердой (агаровой) питательной среды (см. таблицу 5.9.).

На поверхность питательной среды в каждый флакон (матрац), в зависимости от их вместимости (250/500 мл), вносят суспензию, смытую с 1-2 пробирок с посевами. Взвесь покачиванием флакона (матраца) равномерно распределяют по поверхности среды, закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками и инкубируют при температуре 55±1°С (G. stearothermophilus) или 37±1°С (B. licheniformis) в течение 10-12 суток в наклонном положении (под углом 45°) агаром вверх. Для создания достаточной влажности в

термостат, работающий при температуре 55±1°С, помещают открытые емкости с водой (до 2 л на термостат вместимостью 80 л).

Тест-микроорганизмы B. cereus, B. subtilis и B. anthracis для получения споровой формы засевают на скошенный пшеничный агар или агар Хоттингера с аминным азотом 120 мг% и выращивают при температуре 37±1°С двое суток в термостате, а затем еще 7-12 суток при температуре 20±1°С в темном месте. На 7 и 9 сутки культуры проверяют на интенсивность спорообразования. Для этого выборочно с 2-3 флаконов (матрацев) культуру забирают петлей с верхнего, среднего и нижнего участков агара; все три пробы растирают вместе на одном предметном стекле, распределяя тонким слоем. Мазок фиксируют над пламенем горелки, окрашивают по Граму или генцианвиолетом (по Синеву). Окрашенные препараты промывают питьевой водой, подсушивают и микроскопируют с иммерсионной системой – споры имеют вид неокрашенных пустот, находящихся внутри клеток.

При работе с B. anthracis для фиксации мазков используют 90% этиловый спирт или смесь Никифорова (равное количество спирта и эфира), время фиксации 30 мин. Затем мазок окрашивают при нагревании 1-2 мин. карболовым фуксином Циля, промывают питьевой водой и обесцвечивают, погружая в 2% раствор азотной кислоты в спирте или в 1% раствор серной кислоты, так, чтобы на препарате не было видно следов красителя.

Исследуют 10 полей зрения, подсчитывают количество спор, выражая в процентах. Достаточным количеством считают не менее 90 % спор в поле зрения от общего числа клеток.

После завершения спорообразования тест-микроорганизмы осторожно при помощи шпателя (из проволоки) или стерильных стеклянных бус смывают с поверхности агара 5-10 мл стерильной

питьевой водой (в зависимости от вместимости флакона) и сливают в емкости (пробирки, флаконы), которые закрывают стерильными резиновыми пробками.

Для оценки качества полученной споровой суспензии тест-микроорганизма и принятия решения о возможности использования ее по назначению, из флакона (после тщательного перемешивания путем встряхивания) стерильно отбирают в пробирку 10 мл суспензии и определяют соответствие требованиям по биологической концентрации (БК) спор тест-микроорганизма в суспензии и их устойчивости к эталонным физическим и химическим дезинфицирующим и стерилизующим средствам, представленным в таблице 5.8.

В случае загрязнения исходного штамма тест-микроорганизма посторонней микрофлорой выделяют чистую культуру его принятыми методами (прогревания, промывания, центрифугирования и др.). Выделенную культуру тест-микроорганизма идентифицируют и проверяют устойчивость его к эталонным дезинфицирующим и стерилизующим средствам.

1.7.1.3 Определение биологической концентрации тест-микроорганизма в споровой суспензии

Определение выполняют методом последовательных десятикратных разведений суспензии тест-микроорганизма в стерильной дистиллированной воде с последующим высевом суспензии в чашки Петри с плотной питательной средой (агар Хоттингера, СПА, МПА). После определенного времени инкубации при соответствующей температуре проводят подсчет выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяют количество жизнеспособных спор в одном мл суспензии (БК).

Для проведения испытания необходимы материалы и оборудование, приведенные в Приложении 3.

При выполнении испытания соблюдают следующие условия:

1) используют дозаторы переменного объема не менее 2-го класса точности;

2) в процессе выполнения опыта соблюдают асептические условия;

3) контролируют температуру термостата и срок инкубации посевов.

До проведения испытания выполняют следующие подготовительные операции:

– расплавляют на кипящей водной бане плотную питательную среду (агар) и охлаждают ее до температуры 45±5°С;

– охлажденную питательную среду разливают по 25±5 $см^3$ в стерильные чашки Петри в пламени спиртовки (газовой горелки) и оставляют чашки на горизонтальной поверхности, пока не застынет агар;

– при необходимости подсушивают чашки с плотной питательной средой в термостате крышками вниз;

– разливают в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками по 4,5 см3 стерильной дистиллированной воды.

В работе используют только кондиционные партии питательных сред, для чего предварительно проверяют их качество путем высева эталонной культуры соответствующего штамма. Для кондиционной среды число выросших тест-микроорганизмов от их общего количества должно составлять не менее 50%.

При определении БК тест-микроорганизма в исходной суспензии спор агаровой культуры, последнюю разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации, соответствующей по бактериальному стандарту мутности 1 млрд микробных тел в 1 мл. Затем стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл суспензии спор и переносят в пробирку, содержащую 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученное разведение (10^{-1}) тщательно встряхивают. Аналогично, меняя пипетку, делают все последующие разведения до необходимого (10^{-6}), теоретически соответствующего концентрации $1 \cdot 10^3$ спор в 1 мл. Из двух последовательных десятикратных разведений исходной суспензии производят высев по 0,1 мл на поверхность трех чашек Петри с агаром (агар Хоттингера, СПА, МПА). Чашки Петри инкубируют при температуре 55±1°С или 37±1°С в зависимости от вида культуры в течение 24-48 ч, после чего определяют число КОЕ. Количество жизнеспособных спор в исходной суспензии определяют как среднее арифметической число КОЕ с учетом разведения исходной суспензии и объема пробы для посева.

Пример расчетов.

Предположим, что при посеве на три чашки Петри с агаром суспензии в разведении 1:100 000 подсчитано 140, 110 и 134 КОЕ. Аналогичные высевы из разведений 1:1 000 000 привели к образованию 12, 14 и 16 КОЕ.

Вычисляем общее число КОЕ, найденных во всех трех чашках Петри соответствующих разведений:

1:100 000 140+110+134=384

1:1 000 000 12+14+16=42

Среднее число КОЕ на чашках составит для разведения

1:100 000 384:3=128

1:1 000 000 42:3=14

Из расчета посевной дозы (0,1 мл на каждую чашку) вычисляем число жизнеспособных спор в 1 мл исходной суспензии с учетом разведений, далее находим среднее арифметическое числа КОЕ:

128·10·105 = 12,8·107

14·10·106 =14,0·107

Таким образом, число жизнеспособных спор в исходной суспензии составит: (12,8+14,0) ·107 : 2=13,4·107 =1,32·108 спор/мл.

Или при посеве из одного последнего разведения по 0,1 мл на 5 чашек Петри расчет концентрации жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл суспензии препарата осуществляют по формуле:

БК = х·р·2,

где:

БК – концентрация жизнеспособных спор тест-микроорганизма, КОЕ·мл;

х – суммарное количество колоний, выросших на пяти чашках, КОЕ;

р – разведения;

2 – коэффициент, приводящий измерение объема посеянной суспензии к 1 мл.

Например: общее количество колоний на 5 чашках Петри составило 540 КОЕ, тогда количество жизнеспособных спор в исходной суспензии равно: БК = 540·2·106=1080·106=1,08·109 спор/мл.

Герметично закрытые стерильной пробкой флаконы (пробирки) с исходной суспензией спор хранят в холодильнике при температуре 6±2°С до 6 месяцев, если споры тест-микроорганизма соответствуют вышеуказанным требованиям (таблица 1). Для снижения негативного

влияния на суспензию спор перепада температуры, неизбежного при извлечении флакона из холодильника для отбора части суспензии, необходимой для проведения исследования ДС, СС и их субстанций, суспензию спор тест-микроорганизма из флакона целесообразно расфасовывать в пробирки и использовать их по мере необходимости.

Чистоту культуры тест-микроорганизма на всех этапах культивирования контролируют путем посева ее на чашки Петри с агаром Хоттингера, СПА, МПА.

Сибиреязвенную живую сухую вакцину (СТИ-1) при изучении спороцидной активности и эффективности используют в виде суспензии, содержащей 10^8-10^9 спор/мл, приготовленной разбавлением содержимого одной ампулы в 10 мл стерильной питьевой воды.

1.7.1.4 Методики определения устойчивости спор тест-микроорганизмов к эталонным ДС

1.7.1.4.1 Определение устойчивости спор к текучему пару, водяному насыщенному пару под избыточным давлением, сухому горячему воздуху

Устойчивость к действию текучего пара спор B. cereus, B. subtilis, B. anthracis, сибиреязвенной вакцины СТИ-1 определяют в аппарате Ойль-Мюллера, используя батистовые тест-объекты, контаминированные вышеуказанными тест-микроорганизмами, с последующим посевом тест-объектов в жидкую питательную среду.

Аппарат Ойль-Мюллера может быть заменен устройством, доступным для изготовления практически в любой лаборатории, где необходимо провести такое исследование. Для этого берется стеклянная колба объемом 1-2 л с широким удлиненным горлом. Корковую пробку под него срезают на 1/3 по длине для обеспечения выхода пара. Это отверстие используется и для проведения измерения термометром

температуры пара в месте размещения батистовых тест-объектов. Через трубку пропускают проволоку, имеющую на конце припаянную (или укрепленную другим способом) перпендикулярно к ней металлическую сеточку диаметром 3-3,5 см из нержавеющей стали, предназначенную для размещения батистовых тест-объектов, контаминированных спорами тест-микроорганизма.

Проволоку в пробке устанавливают так, чтобы сеточка находилась в месте перехода конуса колбы в горло. Это обеспечивает прохождение через сеточку практически всего объема выделяемого кипящей в колбе водой пара. Уровень воды должен находиться от сеточки на расстоянии 5-6 см.

В процессе испытаний контролируют следующие показатели:

температуру текучего пара;

исходную и остаточную контаминацию тест-микроорганизмами батистовых тест-объектов;

время действия пара на контаминированные тест-объекты в аппарате Ойль-Мюллера (колбе).

Исследования проводят следующим образом: в колбу наливают дистиллированную воду и нагревают ее до кипения. При достижении температуры 100°С на термометре, находящемся под воздействием текучего пара, на предварительно простерилизованную автоклавированием вместе с пробкой или обожженную в пламени сеточку помещают 2 батистовых тест-объекта (1×0,5 см), контаминированных спорами тест-микроорганизма (методику приготовления тест-объектов см. в п. 5.1.2.2.). Тест-объекты размещают так, чтобы исключался контакт их со стенкой горла колбы при введении сеточки в колбу. Держась за пробку, сеточку с тест-объектами вносят в зону действия текучего пара и включают секундомер. По истечении

2 мин. воздействия пара, держась за пробку, сеточку с тест-объектами извлекают из колбы, а тест-объекты сразу помещают (засевают) в две пробирки со стерильным питательным бульоном. Обжигают сеточку и кладут на нее 2 новых тест-объекта. Аналогично вышеописанному вносят их в зону действия пара на 2 мин., затем также извлекают и помещают в пробирки со стерильным питательным бульоном. Так операцию повторяют, увеличивая экспозицию на 1 мин. до 10 мин. Посевы инкубируют при 37±1°С в течение 7 суток. Предварительный учет результатов проводят через 48 часов инкубирования, окончательный – на 7 сутки. Из пробирок с проросшим бульоном делают посев петлей на твердую среду для идентификации выросших тест-микроорганизмов.

При использовании аппарата Ойль-Мюллера необходимо не допускать случайного прикосновения к горлышку колбы сначала до обеззараживания тест-объектов, затем – после обеззараживания. Этих погрешностей, искажающих результаты опыта, можно избежать при использовании аппарата Ойль-Мюллера в модификации Л. А. Блиновой (рис. 2). В емкости для текучего пара имеется четыре отверстия. Первое отверстие (1) размещается вверху и предназначено для термометра, второе (2) – справа в торце – для внесения зараженных тест-объектов, третье (3) – на лицевой стороне – для изъятия обеззараженных тест-объектов и четвертое (4) – слева в торце – для выхода пара. При пользовании таким аппаратом тест-объекты накалывают на иглу, закрепленную в пробке, которую вставляют в отверстие 2. Отверстие 3 во время экспозиции закрыто стерильной пробкой. По окончании экспозиции его открывают и через него извлекают обожженным пинцетом снятые с иглы тест-объекты, которые сразу засевают в бульон.

Применяемый в аппарате термометр должен иметь шкалу с делениями на десятые доли градуса. Определение устойчивости спор бацилл к текучему пару проводят при атмосферном давлении близком к 760 мм рт. ст. Учет этого фактора важен, поскольку существенно может влиять на результаты оценки. Так, при атмосферном давлении 745 мм рт. ст. температура текучего пара составляет 99,4°С и резистентность при этой температуре B. cereus равна 6-7 мин., а при давлении 765 мм. рт. ст. температура пара – 100,8°С резистентность не превышает 3-4 мин.

Споры тест-микроорганизмов должны иметь устойчивость к текучему пару температурой 100°С не менее 7-9 мин.

Устойчивость тест-микроорганизма G. stearothermophilius к водяному насыщенному пару под избыточным давлением. В качестве тест-носителя применяют флаконы из нейтрального стекла, контаминированные суспензией спор тест-микроорганизма G. stearothermophilus.

Предварительно флаконы тщательно моют и стерилизуют паровым или воздушным методом. Из исходной суспензии спор готовят рабочую суспензию для контаминации тест-носителей.

Стерильные тест-носители контаминируют из расчета $(1\text{-}5)\cdot10^6$ тест-микроорганизма G. stearothermophilus, что достигается внесением в каждый носитель с помощью дозатора переменного объема 0,02 мл суспензии спор с содержанием от 5×10^7 до $2{,}5\times10^8$ спор/мл.

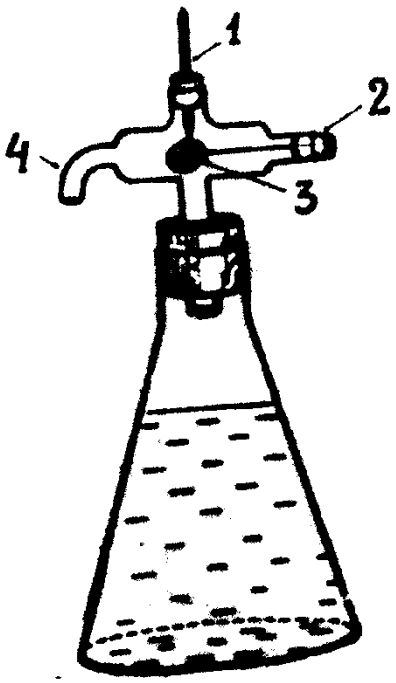


Рисунок 1.1. Принципиальная схема устройства аппарата Ойль-Мюллера в модификации Л. А. Блиновой.

Контаминированные тест-носители высушивают в термостате при температуре 37±1°С в течение 24 часов и закладывают в бумажные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов в Российской Федерации.

Устойчивость спор тест-микроорганизма G. stearothermophilius к водяному насыщенному пару под избыточным давлением определяют в паровом стерилизаторе объемом 75 $дм^3$ с гравитационным способом предварительного удаления воздуха из стерилизационной камеры.

Упакованные тест-носители помещают в стерилизационной коробке в незагруженную камеру парового стерилизатора. После набора давления в водопаровой камере 1,1±0,1 $кгс/см^2$ проводят вытеснение воздуха паром из камеры парового стерилизатора (продувка парового стерилизатора) в течение 10 мин. (при открытом спускном кране и

давлении в стерилизационной камере от 0,1 до 0,2 кгс/см^2). После продувки доводят давление пара в стерилизационной камере до 1,1±0,1 кгс/см^2, 121±1°С и через 5 мин. (время выживания спор тест-микроорганизма) с момента установления давления спускают пар. Для уменьшения времени воздействия пара до и после периода испытуемого воздействия (время воздействия при температуре 121±1°С подъем давления проводят максимум в течение 8 мин., спуск – в течение 3 мин. Контроль температуры осуществляют максимальными термометрами (СП-82).

Аналогичное исследование проводят с 15-минутным временем воздействия (время гибели спор тест-микроорганизма). При каждом из указанных периодов воздействия экспонируют не менее 10 тест-носителей. По окончании времени выдержки тест-носители вынимают из стерилизатора. Во флаконы вносят 1 мл питательной среды (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ, цветная питательная среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым), закрывают стерильными резиновыми пробками (N7,5) и инкубируют при температуре 55±1°С в течение 7 суток при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ) или в течение 48 часов при использовании цветной питательной среды с индикатором бромкрезоловым пурпуровым.

Учет результатов проводят путем визуального осмотра. Отсутствие помутнения/изменения цвета питательной среды с индикатором указывает на гибель спор. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение последних с тест-микроорганизмом.

В качестве контроля используют тест-носители, которые не подвергали действию стерилизующего средства. Посевы контрольных

тест-носителей и питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляют аналогично опытным тест-носителям, которые подвергали действию стерилизующего средства.

Время гибели спор G. stearothermophilius при действии водяного насыщенного пара под избыточным давлением 1,1±0,1 кгс/см^2, температуре 121±1°С должно быть не менее 15 мин.

Устойчивость спор B. licheniformis к сухому горячему воздуху определяют в воздушном стерилизаторе объемом 80 дм^3 с принудительной циркуляцией и скоростью движения воздуха более 1 м/с, которые обеспечивают допустимые предельные отклонения от номинального значения температуры.

В качестве тест-носителя применяют флаконы из нейтрального стекла, контаминированные спорами тест-микроорганизма B. licheniformis. Предварительно флаконы тщательно моют и стерилизуют паровым или воздушным методом. Из исходной суспензии спор готовят рабочую суспензию для контаминации тест-носителей из расчета (1-5)×10^6 спор в носителе.

Стерильные тест-носители контаминируют рабочей суспензией спор тест-микроорганизма B. licheniformis, что достигается внесением в каждый тест-носитель с помощью дозатора с переменным объемом 0,02 мл суспензии спор в дистиллированной воде с содержанием от 5,0×10^{7}до 2,5×10^8 спор/мл.

Контаминированные тест-носители высушивают в термостате при температуре 37±1°С в течение 24 часов и закладывают в бумажные или полимерные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов в Российской Федерации.

Упакованные тест-носители помещают на полку воздушного стерилизатора, предварительно прогретого до 140°С. Стерилизатор

закрывают и после достижения температуры 160±3°С начинают отсчет времени выдержки. Через 4 мин. (время выживания спор тест-микроорганизма) аппарат отключают. Контроль температуры осуществляют по наружному термометру.

Аналогичное исследование проводят с 30-минутным временем испытуемого воздействия (время гибели спор тест-микроорганизма). При каждом из указанных периодов испытуемого воздействия экспонируют не менее 10 тест-носителей.

По окончании времени выдержки тест-носители вынимают из стерилизатора. Во флаконы вносят 1 мл питательной среды (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ, цветная питательная среда с индикатором бромтимоловым синим) и закрывают стерильными резиновыми пробками (N7,5) и инкубируют при температуре 37±1°С в течение 7 суток при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ) или в течение 48 часов при использовании цветной питательной среды с индикатором бромтимоловым синим.

Учет результатов опытов и контроля проводят аналогично как при определении устойчивости спор к водяному насыщенному пару под давлением.

Время гибели спор тест-микроорганизма B. licheniformis при действии сухого горячего воздуха при температуре 160±3°С должно быть не менее 30 мин.

1.7.1.4.2 Определение устойчивости спор к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду

Устойчивость к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду у спор B. cereus, B. subtilis, B. anthracis, живой сухой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 определяют методом погружения

батистовых тест-объектов, контаминированных споровой суспензией указанных культур (п. 5.1.2.2) в 10% раствор хлорамина, 6% раствор перекиси водорода, 2,5% раствор глутарового альдегида с последующей нейтрализацией действующих веществ и посевом в жидкую питательную среду.

В процессе испытаний контролируют концентрацию действующего вещества в рабочем растворе ДС, температуру его в опыте, исходный и остаточный уровень контаминации спорами тест-микроорганизма тест-объекта, время выдержки тест-объектов в испытуемом дезинфицирующем растворе.

Определение устойчивости спор к хлорамину.

Йодометрическим методом определяют процент активного хлора в хлорамине. В опытах используют препарат, содержащий 26-28% активного хлора, растворяя который в воде готовят 10% (по препарату) рабочий раствор. Готовят и разливают в пробирки по 5 мл стерильный раствор нейтрализатора (2 % раствор тиосульфата натрия), стерильную питьевую воду, питательный бульон (МПБ). Готовят и контаминируют тест-микроорганизмом батистовые тест-объекты (см. п. 5.1.2.2.). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные спорами тест-микроорганизма тест-объекты, то их заранее извлекают из холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18-20°С).

При проведении экспериментов в стеклянную емкость объемом 50-100 мл пипеткой наливают требуемый объем 10% раствора хлорамина, из расчета 0,5 мл на каждый тест-объект и помещают в водяную баню с температурой 20°С на весь период опыта. Отсчитывают в чашке Петри необходимое для опыта количество контаминированных спорами тест-микроорганизмов батистовых тест-объектов (по 2 на

каждую экспозицию), захватывают их стерильным пинцетом все сразу и опускают в емкость с раствором хлорамина; легким покачиванием емкости добиваются полного их смачивания. В момент смачивания всех тест-объектов отмечают время.

Через каждый час стерильной петлей извлекают по 2 тест-объекта из раствора хлорамина и опускают их в пробирку с 5 мл 2% стерильного раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточного действия хлорамина. Через 5-10 мин. тест-объекты переносят во вторую пробирку с 5 мл стерильной питьевой воды, а через 10-15 мин. каждый тест-объект помещают в 5 мл питательного бульона.

Для контроля два контаминированных спорами тест-микроорганизма тест-объекта погружают в стерильную питьевая воду (вместо раствора хлорамина) на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их переносят последовательно в раствор нейтрализатора (тиосульфат натрия), стерильную питьевую воду и сеют в жидкий питательный бульон в пробирках. Полноту нейтрализации активного хлора контролируют путем погружения неконтаминированных тест-объектов в раствор 10% хлорамина на максимальную экспозицию, затем в раствор тиосульфата натрия, промывают в воде и помещают в бульон, куда вносят 0,1 мл суспензии, содержащей 20-30 жизнеспособных спор тест-микроорганизма. Рост культуры в бульоне свидетельствует об эффективной нейтрализации действия хлорамина.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре 37±1°С; наличие роста тест-микроорганизма проверяют через 48 часов. Из пробирок с ростом делают посев петлей на твердую питательную среду для идентификации тест-микроорганизмов. Окончательный учет результатов проводят через 7 суток.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Споры тест-микроорганизмов: B. cereus, B. Subtilis, B. anthracis, живой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 должны быть устойчивы к 10% раствору хлорамина не менее 360 мин.

Определение устойчивости спор к перекиси водорода.

Иодометрическим методом определяют концентрацию перекиси водорода в средстве «Перекись водорода медицинская». В опытах используют средство, содержащее не менее 30% перекиси водорода, из которого путем разведения стерильной питьевой водой готовят раствор для исследований, содержащий 6% перекиси водорода. Для нейтрализации перекиси водорода используют стерильный 2,5% раствор тиосульфата натрия. Подготовку и определение устойчивости спор тест-микроорганизмов к 6% раствору перекиси водорода проводят по такой же методике, как и к хлорамину, только в качестве нейтрализатора используют 2,5% раствор тиосульфата натрия. Учитывая, что споры тест-микроорганизмов должны быть устойчивы к воздействию 6% раствора перекиси водорода в течении не менее 60 мин., испытание осуществляют в течение 90 мин. с отбором проб (по 2 теста) через каждые 15 мин. (обычно берут по 2 тест-объекта на 6 экспозиций). Аналогичные, как и при определении устойчивости спор к хлорамину, проводят посевы, учет результатов и контроль.

Споры тест-микроорганизмов: B. cereus, B. subtilis, B. anthracis, живой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 должны быть устойчивы к 6% раствору перекиси водорода не менее 60 мин.

Определение устойчивости спор B. subtilis к 2,5% раствору глутарового альдегида.

Определяют концентрацию глутарового альдегида в исходном (концентрированном) растворе глутарового альдегида. В экспериментах используют средство, содержащее не менее 20% глутарового альдегида.

Раствор для исследований, содержащий 2,5% глутарового альдегида, готовят путем разведения исходного раствора стерильной питьевой водой с последующим доведением pH приготовленного раствора до значений 7,5. Подготовку и определение устойчивости спор B. subtilis к 2,5% раствору глутарового альдегида проводят по такой же методике, как и к хлорамину, используя батистовые тест-объекты, контаминированные этим тест-микроорганизмом, только в качестве нейтрализатора используют или стерильный 1% раствор бисульфита натрия или стерильный универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,1%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%). Учитывая, что споры некоторых тест-микроорганизмов должны быть устойчивы к воздействию 2,5% раствора глутарового альдегида не менее чем в течение 3 часов, испытание осуществляют в течение 6 часов с отбором проб (по 2 тест-объекта) через каждые 30 мин. Посевы, учет результатов и постановку контроля осуществляют аналогично определению устойчивости спор к хлорамину.

Споры тест-микроорганизма B. subtilis должны быть устойчивы к 2,5% раствору глутарового альдегида не менее 3 часов.

1.7.2 Обеспечение стандартности условий проведения исследований спороцидной активности ДС, СС и их субстанций

Химико-аналитический контроль ДС, СС и их субстанций. До проведения исследования спороцидной активности ДС, СС и их субстанций необходимо проанализировать представленные производителем утвержденные рецептуры средства и технические условия на отечественные или спецификацию на зарубежные средства, провести химико-аналитические исследования по определению концентрации действующих веществ и определить соответствие ее и

других показателей, регламентированных вышеуказанными документами. При этом используют химико-аналитические методы контроля и применяют условия хранения средства и меры безопасности при работе с ним, предложенные производителем средства.

Выбор, приготовление и контроль эффективности нейтрализаторов ДС с целью исключения остаточного спороцидного или споростатического действия ДС, СС и их субстанций на тест-микроорганизмы. Для дезинфекции и стерилизации применяют средства, обладающие спороцидным действием, то есть убивающие споры, но не задерживающие только их рост. Поэтому при определении спороцидного действия необходимо разграничить спороцидное действие средства от споростатического.

На основании накопленного опыта для нейтрализации антимикробного действия ДВ из различных химических групп (в зависимости от концентрации ДВ в растворе) применяют следующие нейтрализаторы:

для средств из группы окислителей (хлор-, йод-, перекисьсодержащие средства; средства, содержащие надуксусную кислоту, озон) – 0,5-2,5% растворы тиосульфата натрия;

для альдегид- и фенолсодержащих средств – универсальный нейтрализатор, содержащий 3% полисорбита 80% (твин-80), 3% сапонина, 0,1% гистидина и 0,1% цистеина; или 3% полисорбита 80%, 2% гистидина, 0,3% лецитина, 3% сапонина;

для композиционных ДС – универсальный нейтрализатор, например, содержащий 3% полисорбита 80%, 3% сапонина, 0,1% гистидина и 0,1% цистеина или 3% полисорбита 80%, 3% сапонина, 0,3% лецитина и 0,15% цистеина, 0,15% тиосульфата натрия, или другие нейтрализаторы, рекомендуемые производителями.

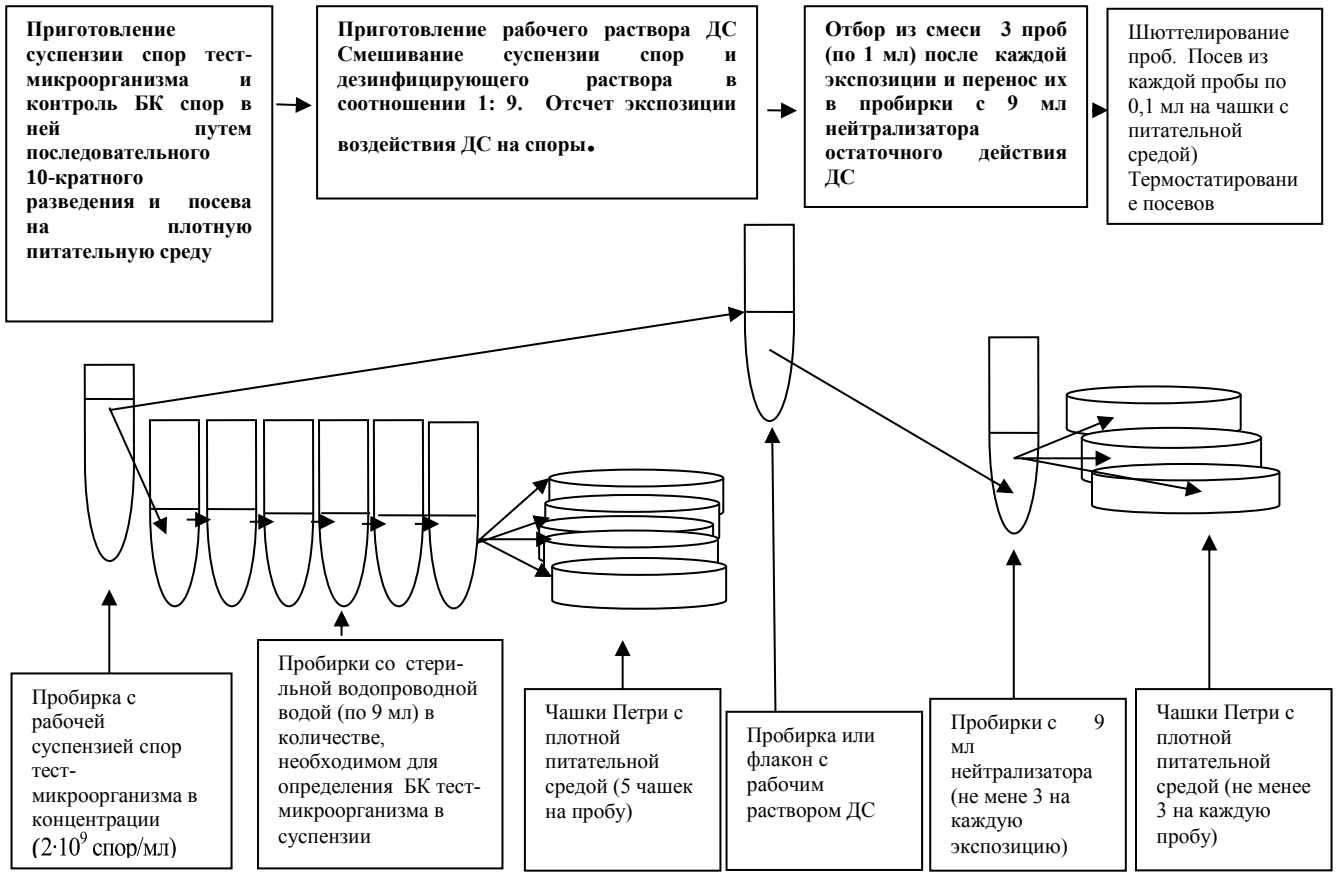
Растворы нейтрализаторов готовят в асептических условиях, применяя только стерильную дистиллированную воду. При невозможности соблюдения асептических условий приготовления нейтрализаторов, допускается стерилизация готовых растворов автоклавированием при 1,1 кГс/см^2 (121°С) в течение 15 мин. Температура растворов нейтрализаторов должна быть плюс 20°С, независимо от температуры окружающей среды. Готовые растворы необходимо использовать в день приготовления. Допускается хранение готовых растворов при температуре 4°С в течение 48 часов.

Контроль полноты нейтрализации остаточного действия испытываемого средства.

Для контроля эффективности нейтрализатора и полноты нейтрализации остаточного действия ДС используют суспензионный метод, как обеспечивающий наиболее жесткие условия действия нейтрализатора при проведении испытаний ДС. Последовательность и методология выполнения основных операций при проведении такого эксперимента и их назначение приведены на схеме рисунка 5.2. и в таблице 5.10.

Обеспечение техники безопасности при исследовании спороцидной активности ДС, СС и их субстанций. Споры тест-микроорганизмов обладают высокой устойчивостью, поэтому их гибель обеспечивают в большинстве случаев, высокие концентрации ДС, СС и их субстанций и по препарату, и по ДВ. Поэтому при хранении, взвешивании, приготовлении рабочих растворов, их химико-аналитических исследованиях и проведении экспериментов необходимо применять меры защиты, предусмотренные в технических условиях на отечественные средства или спецификации - на зарубежные, с учетом класса их опасности.

Рис. 1.3 Схема алгоритма проведения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС суспензионным методом



В опытах с вирулентным тест-микроорганизмом возбудителя сибирской язвы, кроме посева на твердую питательную среду, пробу по 0,2 мл вводят внутрибрюшинно белым мышам весом по 10-12 г. Параллельно проводят контрольное заражение животных питательной средой с нейтрализатором и суспензией спор исходного тест-микроорганизма. Количество животных в контрольных группах – не менее 3. Наблюдают за животными в течение 48-96 часов.

Как павших, так и усыпленных эфиром мышей вскрывают, делают посев органов на элективные среды для выявления роста возбудителя сибирской язвы и его идентификации; инкубирование чашек Петри с посевами проб при температуре 37±1°С или 55±1°С в зависимости от тест-микроорганизма в течение 2-7 суток и учет результатов.

Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие жизнеспособных спор в посевах соответствующих им проб.

Количество и интервал (шаг) экспозиций, при которых осуществляют отбор проб на эффективность ДС, выбирают на основе учета данных о составе и эффективности входящих в средство действующих веществ.

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин. полную гибель спор одного из рекомендуемых споровых тест-микроорганизмов, рассматривают как перспективное спороцидное средство для дальнейшего изучения: определения спектра спороцидного действия, факторов, влияющих на спороцидную активность ДС и др.

1.7.3.2 Метод батистовых тест-объектов

Метод батистовых тест-объектов используют для получения информации о концентрации и времени эффективной спороцидной активности ДС. В принципиальном плане методология выполнения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС методом батистовых тест-объектов приведена на схеме рисунка 5.4.

Как видно из схемы рисунка 5.4, для проведения опыта по оценке спороцидной активности ДС методом батистовых тест-объектов необходимо приготовить:

стерильные батистовые тест-объекты размером 1х0,5 см путем погружения куска батиста на 24 часа в холодную питьевую воду для удаления аппплитуры. Затем ткань тщательно стирают с мылом, прополаскивают в холодной воде, кипятят, сушат и гладят горячим утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 11 мм друг от друга, а в поперечном направлении – 6 мм. По этим линиям батист разрезают ножницами на отдельные тест-объекты; раскладывают по 50 штук в чашки Петри, упаковывают в бумагу и стерилизуют в паровом стерилизаторе;

рабочую суспензию тест-микроорганизма с концентрацией не менее $1 \cdot 10^9$ спор/мл для контаминации батистовых тест-объектов;

пробирки со стерильной питьевой водой (10 мл) для контроля реальной биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма на контаминированных тест-объектах;

испытываемый раствор ДС в емкости (пробирка, колба или стакан) в количестве, достаточном для замачивания всех взятых в опыт тест-объектов, исходя из расчета 0,5 мл раствора на 1 тест-объект;

необходимое количество пробирок (в зависимости от количества проб, отбираемых для определения времени полной гибели спор тест-микроорганизма под действием ДС), содержащих по 9 мл нейтрализатора, проверенного предварительно на эффективность нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС на тест-микроорганизм (см. п. 5.8.2.);

чашки Петри со стерильной плотной питательной средой для посева проб контроля БК тест-микроорганизма на тест-объекте и проб контроля эффективности действия ДС на тест-микроорганизм.

Методика проведения самого опыта по оценке спороцидной активности ДС предусматривает, как видно из схемы, последовательное выполнение следующих этапов (рис. 5.4):

тщательное перемешивание хранимой в пробирке или во флаконе при температуре 6±2°С исходной суспензии агаровой культуры тест-микроорганизма путем встряхивания пробирки (флакона) в течение 2-3 мин.; приготовление из нее рабочей суспензии тест-микроорганизма в концентрации не менее $1 \cdot 10^9$ спор/мл и в количестве, достаточном для контаминации используемых в опыте тест-объектов (из расчета 0,2 мл на тест-объект);

контаминация батистовых тест-объектов тест микроорганизмом. Для этого помещают в чашку Петри необходимое для опыта количество стерильных батистовых тест-объектов; заливают их приготовленной рабочей суспензией спор тест-микроорганизма, обеспечивая их равномерное смачивание, и оставляют их в суспензии в закрытой чашке Петри на 20 мин. С соблюдением асептики контаминированные тест-объекты переносят на стерильную фильтровальную бумагу, уложенную в два слоя в стерильной чашке Петри, покрывают их листом такой же бумаги и закрывают чашку крышкой; через 10 мин. перекладывают

тест-объекты на сухую стерильную фильтровальную бумагу в стерильной чашке Петри и подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 60 мин. с приоткрытыми крышками. Высушенные тест-объекты, контаминированные спорами тест-микроорганизма, помещают в чашки Петри в холодильник и хранят при температуре 6±2°С, используя для проведения опытов в течение не более 3-4 суток;

с целью контроля микробной контаминации тест-объектов определяют БК спор на них. Для этого контаминированные спорами батистовые тесты погружают в пробирки с 10 мл стерильной питьевой воды и встряхивают в течение 10-15 мин. на шейкере для отмывания спор с тест-объекта. Затем делают 3 последовательных 10-кратных разведения, чтобы получить суспензию с концентрацией порядка 1×10^3 спор/мл, из которой производят посев по 0,1 мл на 5 чашек с плотной питательной средой. Посевы инкубируют в термостате при 37±1°С или 55±1°С в течение 2-4 суток и подсчитывают общее количество выросших на чашках КОЕ. Используя формулу определения БК, приведенную в п. 5.8.1.3., рассчитывают количество жизнеспособных спор тест-микроорганизма на тест-объекте;

приготовление испытываемого рабочего раствора ДС в соответствующей емкости из расчета 0,5-1,0 мл на тест-объект;

помещение испытываемого рабочего раствора ДС на водяную баню с заданной температурой. Если задачей эксперимента не предусмотрено изучение влияния воздействия температуры на эффективность средства, то оценка эффективности раствора испытываемого средства осуществляется при температуре 18-20°С;

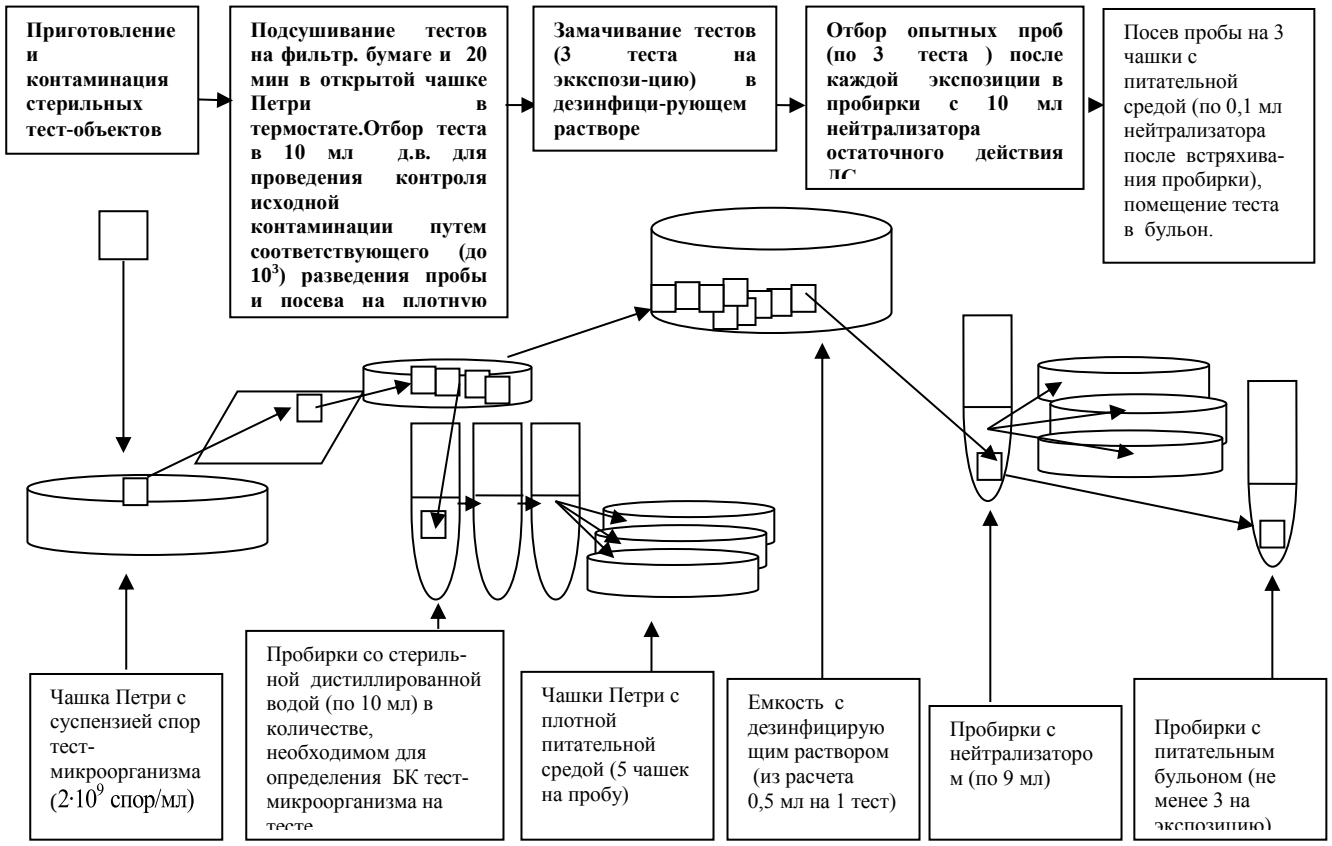
замачивание необходимого для обеспечения отбора проб количества контаминированных тест-объектов в дезинфицирующем

растворе с заданной температурой и отсчет по секундомеру времени начала воздействия ДС на тест-микроорганизм;

отбор (по окончании каждой заданной экспозиции) стерильным пинцетом (петлей) тест-объектов (не менее 3 на экспозицию), которые помещают в пробирку с 10 мл заранее проверенного на эффективность нейтрализатора остаточного действия ДС на тест-микроорганизм.

Определение наличия жизнеспособных спор на тест-объекте. Если предусматривается только установление наличия на данную экспозицию оставшихся на тест-объекте жизнеспособных спор тест-микроорганизма, то проба не подвергается встряхиванию, а тесты стерильным пинцетом извлекают из нейтрализатора и помещают в пробирку со стерильным питательным бульоном. Если предусматривается количественное определение оставшихся на тест-объекте жизнеспособных спор тест-микроорганизма, то на стерильную плотную питательную среду в чашках Петри сеют по 0,1 мл стерильной пипеткой из нейтрализованной пробы (или из ее соответствующего разведения), полученной после интенсивного встряхивания тест-объектов вручную в течение 5-10 мин. на шейкере;

Рис. 1.4 Схема алгоритма проведения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС методом батистовых тест-объектов.



инкубирование посевов в чашках Петри или пробирках проводят при температуре 37±1°С или 55±1°С в зависимости от вида тест-микроорганизма в течение 2-4 суток;

учет и анализ результатов эксперимента (испытания).

Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие жизнеспособных спор в посевах соответствующих им проб.

Количество и интервал (шаг) экспозиций, при которых осуществляется отбор проб на эффективность ДС, выбирают на основе данных о составе и эффективности входящих в средство действующих веществ.

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин. полную гибель спор одного из рекомендуемых споровых тест-микроорганизмов, может рассматриваться как перспективное спороцидное ДС для дальнейшего изучения.

Исследование спектра спороцидной активности химических ДС, СС и их субстанций проводят с использованием следующих тест-микроорганизмов: B. cereus, B. subtilis, B. anthracis, сибиреязвенной сухой живой вакцины СТИ-1. Дальнейшие исследования проводят, используя наиболее устойчивый тест-микроорганизм.

1.7.3.3 Методы изучения факторов, влияющих на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций

Спектр спороцидной активности ДС, СС и их субстанций и зависимости его от температуры, величины pH и присутствия белковых загрязнений.

Исследования проводят методом батистовых тест-объектов (п.5.8.3.2.).

Определение спектра спороцидного действия ДС, СС и их субстанций используют споровые тест-микроорганизмы, рекомендуемые для изучения и оценки спороцидной активности (п. 1.8.1.1., табл. 1.8.).

На основании полученных данных определяют целесообразность дальнейших исследований для применения в качестве ДС, СС и их субстанций.

Определение влияния температуры на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций проводят с целью выявления возможности использования подогретых растворов ДС для сокращения времени обеззараживания объектов в отношении спор тест-микроорганизмов, а также для оценки эффективности спороцидного действия при пониженных температурах окружающей среды, обеззараживаемого объекта и самого раствора ДС.

Для изучения влияния температуры рабочие растворы испытуемых ДС готовят в день опыта, наливают в стеклянные колбы (пробирки) из расчета по 0,5 мл на каждый тест-объект.

Исследование влияния положительных температур раствора ДС на его спороцидную активность проводят с использованием водяной бани, в которой нагревают емкость с дезинфицирующим раствором до 18±1°С, 37±1°С, 55±1°С, после чего погружают в него контаминированные тест-объекты и поддерживают эти температуры в процессе всего опыта.

Опыты по оценке влияния пониженной температуры на активность ДС проводят с использованием криостата или солевых низкозамерзающих растворов, в которых охлаждают емкость с

дезинфицирующим раствором до 10±1°С, 5±1°С, минус 20±1°С и поддержания их в процессе опыта. После достижения указанной температуры в раствор ДС погружают батистовые тест-объекты, контаминированные тест-микроорганизмом из расчета 2 тест-объекта на каждую экспозицию.

Через определенные промежутки времени из каждой колбы извлекают по 2 тест-объекта и помещают их в пробирки с соответствующим нейтрализатором на 5 мин., затем во вторую пробирку со стерильной питьевой водой на 5 мин. и только после этого каждый тест-объект переносят в пробирку, заполненную 5 мл бульона Хоттингера (рН 7,2). Посевы инкубируют в течение 48-72 часов при 37±1°С. Контролем служат по 2 тест-объекта при каждой исследованной температуре, не подвергавшиеся действию испытуемого ДС, но погруженные в пробирки со стерильной питьевой водой на срок, равный действию испытуемого ДС.

Определение влияния величины рН на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций начинают с приготовления рабочих растворов ДС, имеющих различную величину рН (5,6-6,0; 7,0; 8,5-9,0). Для подкисления раствора используют децинормальный раствор соляной или другой кислоты, а для подщелачивания – децинормальный раствор щелочи. В подготовленные растворы погружают контаминированные спорами батистовые тест-объекты. Исследование зависимости спороцидной активности ДС, СС и их субстанций от величины рН проводят по методике, описанной выше, только при нейтрализации действия действующих веществ одновременно понижают и величину рН, добавляя соответственно кислоту или щелочь.

Определение влияния белковых загрязнений на спороцидную активность ДС проводят с целью выявления возможности влияния (или

установления его отсутствия) белковых загрязнений на обеззараживаемом объекте на спороцидную активность ДС.

Исследование проводят методом батистовых тест-объектов (п. 5.8.3.2.), только для контаминации тест-объектов используют суспензию спор тест-микроорганизма, содержащую 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови, которые добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию нормальной сыворотки крупного рогатого скота проводят дробным трехкратным прогреванием на водяной бане при температуре 60±1°С в течение 30 мин. Если активность препарата не снижается в присутствии 20% белка, концентрацию инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови в суспензии тест-микроорганизма, увеличивают до 40%. Отсутствие снижения спороцидной активности ДС при добавлении и 40% сыворотки позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

1.7.4 Методы исследований спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме

Перечень тест-объектов, моделирующих объекты, подлежащие дезинфекции, включает: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и др.; изделия медицинского назначения, в том числе эндоскопы; предметы ухода за больными, игрушки; посуду столовую, лабораторную и из-под выделений; белье, одежду, спецодежду и другие объекты из тканей; изделия из резины, в том числе перчатки, сапоги, фартуки и др.; обувь; руки в резиновых перчатках; остатки пищи;

выделения: фекалии, мочу, кровь, мокроту; воду; воздух; медицинские отходы.

1.7.4.1 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и других объектов

В исследованиях используют тест-поверхности (10×10 см) из различных материалов: дерева (окрашенные масляной или клеевой и другими красками; оклеенные обоями и неокрашенные), линолеума, пластика, кафеля, фаянса, плитки, металлов, стекла.

Тест-поверхности из различных материалов (за исключением поверхностей окрашенных клеевой краской и оклеенных обоями) тщательно моют водой с мылом и щеткой, стерилизуют в паровом стерилизаторе. Тест-поверхности, окрашенные клеевой краской и оклеенные обоями, протирают несколько раз стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой. Готовят споровую суспензию тест-микроорганизма (B. cereus, сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей, B. anthracis), содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, добавляют 40% лошадиной сыворотки, инактивированной при 56°С в течение 30 мин. (к 6 мл суспензии, содержащей $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, прибавляют 4 мл сыворотки).

После подсыхания тест-поверхности располагают горизонтально и на них с помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки наносят 0,5 мл суспензии спор тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по всей тест-поверхности (100 $см^2$) стерильным стеклянным шпателем. Если суспензия тест-микроорганизма не распределяется равномерно, а собирается в каплю, растирание шпателем по тест-поверхности

осуществляют неоднократно (3-5 раз). Контаминированные тест-поверхности подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30-120 мин.). Обеззараживание тест-поверхностей осуществляют способами протирания или орошения дезинфицирующим раствором (при работе с B. anthracis применяют только орошение в боксе биологической защиты при предварительном подсушивании не более 20 мин.).

При поведении экспериментов тест-поверхности, окрашенные клеевой и другими красками, или оклеенные обоями, располагают вертикально и обеззараживают путем орошения дезинфицирующим раствором. Остальные тест-поверхности обеззараживают как в горизонтальном, так и в вертикальном положениях путем орошения, однократного или двукратного протирания, или мытья дезинфицирующим раствором.

В зависимости от вида обрабатываемой поверхности и наличия загрязнений на ней норма расхода ДС способом протирания равна 100-150 мл/м^2 (1-1,5 мл на 100 см^2); способом орошения – 150 мл/м^2 (1,5 мл на 100 см^2) при обработке распылителем типа «Квазар» или его аналогами и 300-500 мл/м^2 (3-5 мл на 100 см^2) при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом.

При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени (15-30-60 мин.) с тест-поверхностей делают смывы путем тщательного протирания тест-поверхности сначала в одном, а затем перпендикулярно ему направлении стерильной марлевой салфеткой (5×5 см), увлажненной нейтрализатором. После протирания на тест-поверхности не должно оставаться излишней влаги.

Салфетки погружают на 5 мин. в пробирки (емкости) с соответствующим для испытуемого ДС нейтрализатором (10 мл), а затем в стерильную питьевую воду с бусами и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Полученную смывную жидкость вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри, тщательно распределяя по всей поверхности. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С в течение 48-72 часов.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных тест-поверхностей вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду из того же расчета, что и опытные. Жидкость, в которую помещают стерильную марлевую салфетку после взятия смыва с контрольных поверхностей, перед посевом разводят в 100 раз и вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С. Учитывают результаты через 48 часов (предварительные), а окончательные – через 21 сутки.

Оценку результатов контрольных опытов проводят по посеву того разведения, в котором число КОЕ на поверхности питательного агара в чашке Петри составляет от 30 до 300.

После выдерживания посевов в термостате подсчитывают число КОЕ на чашках с агаром, рассчитывают плотность контаминации на 100 $см^2$ и высчитывают эффективность обеззараживания, принимая количество тест-микроорганизмов, снятых с контрольных тест-объектов, за 100%.

Например: на посевах со 100 $см^2$ контрольной тест-поверхности обнаружено 148000 КОЕ, а с аналогичного вида опытной тест-поверхности – 20 КОЕ.

148000 - 100 %

20 – x

x = 20×100:148000=2:148=0,013 %

инкубирование посевов в чашках Петри или пробирках проводят при температуре 37±1°С или 55±1°С в зависимости от вида тест-микроорганизма в течение 2-4 суток;

учет и анализ результатов эксперимента (испытания).

Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие жизнеспособных спор в посевах соответствующих им проб.

Количество и интервал (шаг) экспозиций, при которых осуществляется отбор проб на эффективность ДС, выбирают на основе данных о составе и эффективности входящих в средство действующих веществ.

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин. полную гибель спор одного из рекомендуемых споровых тест-микроорганизмов, может рассматриваться как перспективное спороцидное ДС для дальнейшего изучения.

Исследование спектра спороцидной активности химических ДС, СС и их субстанций проводят с использованием следующих тест-микроорганизмов: B. cereus, B. subtilis, B. anthracis, сибиреязвенной сухой живой вакцины СТИ-1. Дальнейшие исследования проводят, используя наиболее устойчивый тест-микроорганизм.

1.7.3.3 Методы изучения факторов, влияющих на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций

Спектр спороцидной активности ДС, СС и их субстанций и зависимости его от температуры, величины pH и присутствия белковых загрязнений.

Исследования проводят методом батистовых тест-объектов (п.5.8.3.2.).

Определение спектра спороцидного действия ДС, СС и их субстанций используют споровые тест-микроорганизмы, рекомендуемые для изучения и оценки спороцидной активности (п. 1.8.1.1., табл. 1.8.).

На основании полученных данных определяют целесообразность дальнейших исследований для применения в качестве ДС, СС и их субстанций.

Определение влияния температуры на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций проводят с целью выявления возможности использования подогретых растворов ДС для сокращения времени обеззараживания объектов в отношении спор тест-микроорганизмов, а также для оценки эффективности спороцидного действия при пониженных температурах окружающей среды, обеззараживаемого объекта и самого раствора ДС.

Для изучения влияния температуры рабочие растворы испытуемых ДС готовят в день опыта, наливают в стеклянные колбы (пробирки) из расчета по 0,5 мл на каждый тест-объект.

Исследование влияния положительных температур раствора ДС на его спороцидную активность проводят с использованием водяной бани, в которой нагревают емкость с дезинфицирующим раствором до 18±1°С, 37±1°С, 55±1°С, после чего погружают в него

контаминированные тест-объекты и поддерживают эти температуры в процессе всего опыта.

Опыты по оценке влияния пониженной температуры на активность ДС проводят с использованием криостата или солевых низкозамерзающих растворов, в которых охлаждают емкость с дезинфицирующим раствором до 10±1°С, 5±1°С, минус 20±1°С и поддержания их в процессе опыта. После достижения указанной температуры в раствор ДС погружают батистовые тест-объекты, контаминированные тест-микроорганизмом из расчета 2 тест-объекта на каждую экспозицию.

Через определенные промежутки времени из каждой колбы извлекают по 2 тест-объекта и помещают их в пробирки с соответствующим нейтрализатором на 5 мин., затем во вторую пробирку со стерильной питьевой водой на 5 мин. и только после этого каждый тест-объект переносят в пробирку, заполненную 5 мл бульона Хоттингера (рН 7,2). Посевы инкубируют в течение 48-72 часов при 37±1°С. Контролем служат по 2 тест-объекта при каждой исследованной температуре, не подвергавшиеся действию испытуемого ДС, но погруженные в пробирки со стерильной питьевой водой на срок, равный действию испытуемого ДС.

Определение влияния величины рН на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций начинают с приготовления рабочих растворов ДС, имеющих различную величину рН (5,6-6,0; 7,0; 8,5-9,0). Для подкисления раствора используют децинормальный раствор соляной или другой кислоты, а для подщелачивания – децинормальный раствор щелочи. В подготовленные растворы погружают контаминированные спорами батистовые тест-объекты. Исследование зависимости спороцидной активности ДС, СС и их субстанций от величины рН

проводят по методике, описанной выше, только при нейтрализации действия действующих веществ одновременно понижают и величину pH, добавляя соответственно кислоту или щелочь.

Определение влияния белковых загрязнений на спороцидную активность ДС проводят с целью выявления возможности влияния (или установления его отсутствия) белковых загрязнений на обеззараживаемом объекте на спороцидную активность ДС.

Исследование проводят методом батистовых тест-объектов (п. 5.8.3.2.), только для контаминации тест-объектов используют суспензию спор тест-микроорганизма, содержащую 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови, которые добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию нормальной сыворотки крупного рогатого скота проводят дробным трехкратным прогреванием на водяной бане при температуре 60±1°С в течение 30 мин. Если активность препарата не снижается в присутствии 20% белка, концентрацию инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови в суспензии тест-микроорганизма, увеличивают до 40%. Отсутствие снижения спороцидной активности ДС при добавлении и 40% сыворотки позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

1.7.4 Методы исследований спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме

Перечень тест-объектов, моделирующих объекты, подлежащие дезинфекции, включает: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных

средств и др.; изделия медицинского назначения, в том числе эндоскопы; предметы ухода за больными, игрушки; посуду столовую, лабораторную и из-под выделений; белье, одежду, спецодежду и другие объекты из тканей; изделия из резины, в том числе перчатки, сапоги, фартуки и др.; обувь; руки в резиновых перчатках; остатки пищи; выделения: фекалии, мочу, кровь, мокроту; воду; воздух; медицинские отходы.

1.7.4.1 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания поверхностей помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и других объектов

В исследованиях используют тест-поверхности (10×10 см) из различных материалов: дерева (окрашенные масляной или клеевой и другими красками; оклеенные обоями и неокрашенные), линолеума, пластика, кафеля, фаянса, плитки, металлов, стекла.

Тест-поверхности из различных материалов (за исключением поверхностей окрашенных клеевой краской и оклеенных обоями) тщательно моют водой с мылом и щеткой, стерилизуют в паровом стерилизаторе. Тест-поверхности, окрашенные клеевой краской и оклеенные обоями, протирают несколько раз стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой. Готовят споровую суспензию тест-микроорганизма (B. cereus, сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей, B. anthracis), содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, добавляют 40% лошадиной сыворотки, инактивированной при плюс 56°С в течение 30 мин. (к 6 мл суспензии, содержащей $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, прибавляют 4 мл сыворотки).

После подсыхания тест-поверхности располагают горизонтально и на них с помощью одноканального механического дозатора или

стеклянной пипетки наносят 0,5 мл суспензии спор тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по всей тест-поверхности (100 $см^2$) стерильным стеклянным шпателем. Если суспензия тест-микроорганизма не распределяется равномерно, а собирается в каплю, растирание шпателем по тест-поверхности осуществляют неоднократно (3-5 раз). Контаминированные тест-поверхности подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30-120 мин.). Обеззараживание тест-поверхностей осуществляют способами протирания или орошения дезинфицирующим раствором (при работе с B. anthracis применяют только орошение в боксе биологической защиты при предварительном подсушивании не более 20 мин.).

При поведении экспериментов тест-поверхности, окрашенные клеевой и другими красками, или оклеенные обоями, располагают вертикально и обеззараживают путем орошения дезинфицирующим раствором. Остальные тест-поверхности обеззараживают как в горизонтальном, так и в вертикальном положениях путем орошения, однократного или двукратного протирания, или мытья дезинфицирующим раствором.

В зависимости от вида обрабатываемой поверхности и наличия загрязнений на ней норма расхода ДС способом протирания равна 100-150 $мл/м^2$ (1-1,5 мл на 100 $см^2$); способом орошения – 150 $мл/м^2$ (1,5 мл на 100 $см^2$) при обработке распылителем типа «Квазар» или его аналогами и 300-500 $мл/м^2$ (3-5 мл на 100 $см^2$) при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом.

При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени (15-30-60 мин.) с тест-поверхностей делают смывы путем тщательного протирания тест-поверхности сначала в одном, а затем перпендикулярно ему направлении стерильной марлевой салфеткой (5×5 см), увлажненной нейтрализатором. После протирания на тест-поверхности не должно оставаться излишней влаги. Салфетки погружают на 5 мин. в пробирки (емкости) с соответствующим для испытуемого ДС нейтрализатором (10 мл), а затем в стерильную питьевую воду с бусами и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Полученную смывную жидкость вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри, тщательно распределяя по всей поверхности. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С в течение 48-72 часов.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных тест-поверхностей вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду из того же расчета, что и опытные. Жидкость, в которую помещают стерильную марлевую салфетку после взятия смыва с контрольных поверхностей, перед посевом разводят в 100 раз и вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С. Учитывают результаты через 48 часов (предварительные), а окончательные – через 21 сутки.

Оценку результатов контрольных опытов проводят по посеву того разведения, в котором число КОЕ на поверхности питательного агара в чашке Петри составляет от 30 до 300.

После выдерживания посевов в термостате подсчитывают число КОЕ на чашках с агаром, рассчитывают плотность контаминации на 100 $см^2$ и высчитывают эффективность обеззараживания, принимая

количество тест-микроорганизмов, снятых с контрольных тест-объектов, за 100%.

Например: на посевах со 100 см^2 контрольной тест-поверхности обнаружено 148000 КОЕ, а с аналогичного вида опытной тест-поверхности – 20 КОЕ.

148000 – 100 %

20 – х

х = 20×100:148000=2:148=0,013 %

Эффективность обеззараживания опытной тест-поверхности составляет:

100 - 0,013=99,987 %.

Критерий эффективности ДС при обеззараживании тест-поверхностей объектов, контаминированных тест-микроорганизмом в споровой форме, равен 100%. При необходимости отработанные в лабораторных условиях режимы обеззараживания подлежат апробации на натурных объектах.

1.7.4.2 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких)

В исследованиях используют тест-объекты (100 см2) и предметы ухода за больными из различных материалов: резин на основе натурального и силиконового каучука (медицинская клеенка, грелка, груша); стекла (поильник, плевательница, градусник); пластмасс (грелка, лоток, наконечник для клизм); металлов (таз, стакан для термометра); игрушки (кроме мягких) из резин и пластмасс.

Тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки из различных материалов тщательно моют водой с мылом и щеткой. Тест-объекты стерилизуют паровым или воздушным методом.

Готовят суспензию тест-микроорганизма, содержащую $2{,}0\times10^9$ спор/мл, к которой добавляют 40% лошадиной сыворотки, инактивированной при 56°С в течение 30 мин. (к 6 мл суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

С помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки на поверхность тест-объекта, предмета ухода за больными, игрушки наносят 0,5 мл суспензии спор тест-микроорганизма. Равномерно ее распределяют по поверхности (100 $см^2$) стерильным стеклянным шпателем. Каналы и полости предмета ухода за больными, игрушек заполняют споровой суспензией с помощью шприца; мелкие игрушки полностью погружают в суспензию. Контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (60-120 мин.).

Растворы ДС готовят на питьевой воде при комнатной температуре. Обеззараживание осуществляют способом погружения, протирания, орошения. После подсушивания контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными, игрушки, в том числе имеющие каналы и полости, погружают в раствор испытуемого ДС или протирают салфеткой, смоченной им. Мелкие игрушки полностью погружают в емкость с раствором ДС, препятствуя их всплытию; крупные игрушки дезинфицируют способом орошения. Норма расхода ДС способом протирания из расчета 100-150 мл/$м^2$ при однократной обработке и 200-300 мл/$м^2$ при двукратной; способом орошения – 150 мл/$м^2$ при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 мл/$м^2$ – при

обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом. При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5-15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени после дезинфекции (30-60-120 мин.) тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки извлекают из раствора, делают смывы стерильной марлевой салфеткой (5×5см), увлажненной нейтрализатором. Салфетки погружают в стерильный раствор нейтрализатора на 5 мин., затем переносят в пробирки (емкости) с бусами и стерильной питьевой водой (10 мл) и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Каналы и полости промывают нейтрализатором (10 мл), который собирают в стерильные пробирки (емкости) и оставляют на 10 мин. для нейтрализации.

Полученную смывную жидкость и смывную жидкость из каналов вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри и равномерно распределяют стерильным шпателем по поверхности среды. В контрольных опытах вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду.

Посевы инкубируют в термостате при температуре 37±1°С. Предварительные результаты учитывают через 48 часов, а окончательные – через 21 сутки.

Критерием эффективности ДС при обеззараживании тест-объектов, предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких), контаминированных тест-микроорганизмом в споровой форме 100% гибель тест-микроорганизмов.

1.7.4.3 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды столовой, лабораторной и из-под выделений

Для определения спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды, в качестве тест-объектов используют набор столовой и чайной посуды: тарелки, стаканы, кружки из различного материала (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью); столовые приборы: ножи, вилки, ложки из различного материала (нержавеющая сталь, алюминий, пластик), посуду одноразового использования и набор лабораторной посуды, представляющий тест-объекты из стекла и пластмасс: предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического анализа и другое; посуда из-под выделений (мочеприемники, подкладные судна). Перед экспериментом посуду и столовые приборы моют водой с мылом и щеткой, затем высушивают.

В качестве тест-микроорганизмов для контаминации посуды используют наиболее устойчивый к данному ДС вид спор.

На посуду (площадь 100 $см^2$) пипеткой наносят 0,5 мл споровой суспензии тест-микроорганизмов, содержащую $2 \cdot 10^9$ спор/мл. Культуру равномерно распределяют по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы погружают в споровую суспензию на 1-2 мин., оставляя неконтаминированными их ручки. Контаминированную посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре (60-120 мин.) и относительной влажности воздуха 50-60% (при работе с B. anthracis подсушивают посуду не более 20 мин.).

Для разработки режимов обеззараживания посуды с остатками пищи при контаминации используют суспензию тест-микроорганизмов,

смешанную с овсяной, манной или другой кашей, сваренной на молоке со сливочным маслом (к 10 г каши добавляют 1 мл 2-миллиардной взвеси спор). Для имитации загрязнения чайной посуды используют кисель (к 10 г киселя добавляют 1 мл 2-миллиардной взвеси спор), лабораторной посуды – 40% инактивированной сыворотки; посуды из-под выделений – 20% эмульсию кала, предварительно растертого в ступке.

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды, столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор. Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора плюс 18-20°С. При необходимости изучают эффективность растворов ДС при температуре 50±1°С.

Дезинфицирующий раствор должен полностью заполнять и с избытком покрыть всю посуду и приборы (из расчета не менее 2 л на 1 комплект). Время обеззараживания посуды от 15 до 240 мин. в зависимости от вида тест-микроорганизма и наличия загрязнения.

Через определенные интервалы времени (например, 15, 30, 60 мин. и т.д.) извлекают по одному предмету разных наименований (например, тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т.д.) из дезинфицирующего раствора и стерильной марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС, тщательно протирают контаминированную часть каждого контаминированного объекта и погружают в 10 мл этого же нейтрализатора на 5 мин., затем салфетку переносят в пробирку со стерильной питьевой водой и бусами. Время отмыва марлевой салфетки – 10 мин. при постоянном встряхивании. После отмыва марлевую салфетку погружают в питательный бульон. Смывную жидкость по 0,1 мл вносят на поверхность питательного агара в 2-3 чашки Петри (по 0,1 мл в каждую

и распределяют стерильным шпателем по всей поверхности среды). Посевы помещают в термостат при температуре 37±1°С. Учет результатов проводят через 48 часов в течение 21 суток.

Контролем служит аналогично контаминированная посуда, которую погружают не в дезинфицирующий раствор, а в такой же объем стерильной питьевой воды.

Критерием эффективности обеззараживания контаминированной посуды является гибель спор тест-микроорганизмов на посуде не менее 100%.

1.7.4.4 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий (МИ), включая эндоскопы

1.7.4.4.1 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских изделий из различных материалов (кроме эндоскопов)

В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и медицинские изделия, в том числе однократного применения, из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их тест-объекты. Перечень инструментов, должен включать разнообразные по форме, характеру поверхности и используемому материалу изделия (гладкие изделия простой конфигурации; изделия, имеющие замковые части, каналы и полости, имеющие насечки и напыления, изделия извитой форма; изделия, изготовленные из нескольких видов материалов и т.д.).

На рабочую поверхность тест-изделия (у замковых изделий – также в область замка, а при наличии каналов и полостей – также в канал изделия) наносят 0,1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл тест-микроорганизма, содержащей 40% инактивированной лошадиной

сыворотки. Мелкие тест-изделия для контаминации погружают в эту суспензию на 15 мин. Контаминированные тест-изделия подсушивают в термостате в течение 20-25 мин. При испытании средств, обладающих фиксирующими свойствами (например, альдегиды), сыворотку добавляют в количестве 5%.

Дезинфицирующие растворы готовят на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до 50±1°С.

После подсушивания контаминированные изделия погружают в раствор испытываемого средства, 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 изделия в области замка. Толщина слоя раствора средства над изделиями должна быть не менее 1 см. Параллельно контаминированные изделия погружают в воду.

Через определенное время (от 15 до 120 мин.) изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой размером 5×5 см, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора на 5 мин., затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой водой и встряхивают с бусами в течение 5-10 мин. Для контроля эффективности обеззараживания делают посев смывной жидкости по 0,1 мл на поверхность соответствующего для тест-микроорганизма агаровой питательной среды, а салфетку помещают в бульон. Канал изделия промывают нейтрализатором, и смывную жидкость засевают по 0,1 мл на плотную питательную среду в чашках Петри. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37±1°С в течение 21 суток. Учет

предварительных результатов проводят через 48 ч и окончательных – через 21 сутки.

Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий 100% гибель спор тест-микроорганизмов на всех изделиях. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая концентрацию или время воздействия.

1.7.4.4.2 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов

В качестве тест-объектов используют фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий – гастроскоп, жесткий – цистоскоп). По 0,1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^9$ спор тест-микроорганизмов наносят с помощью пипетки на наружную поверхность и в канал эндоскопа, подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя им полости и каналы эндоскопа. Через определенное время (от 15 до 60 мин.) изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной в растворе нейтрализатора; салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же стерильного раствора нейтрализатора на 5 мин., а затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой воды, и встряхивают с бусами в течение 5-10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора и смывную жидкость засевают на питательный агар. Проводят также контроль микробной обсемененности использованных для отмыва проб раствора нейтрализатора и питьевой воды. Кратность постановки эксперимента

должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех тест-изделиях и отсутствие тест-микроорганизмов в растворе нейтрализатора. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более, чем до 60 мин.

Положительной считается проба, показывающая характерный рост тест-микроорганизма на питательных средах; изменение жидкой питательной среды (помутнение, осадок, хлопья и т.д.) и характерный рост при посеве и пересеве на плотную питательную среду, или обнаружение тест-микроорганизма в растворе применявшегося нейтрализатора.

Режим дезинфекции, разработанный на имитаторах канала эндоскопа, проверяют при обеззараживании эндоскопа, контаминированного тест-микрорганизмом. При необходимости эффективность разработанного режима проверяют в практических условиях.

Критерием эффективности ДС (режим применения ДС) при обеззараживании медицинских изделий (включая эндоскопы) является 100% гибель спор тест-микроорганизма.

1.7.4.5 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани

Исследования с ДС проводят в целях оценки эффективности его для обеззараживания белья и других объектов из ткани, чистых и загрязненных кровью или выделениями (фекалии, моча, мокрота).

Оценку эффективности ДС для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани осуществляют с помощью стерильных тест-объектов, представляющих собой кусочки бязи размером 2×2 см. Бязь предварительно готовят и обеззараживают также, как батист. Контаминируют стерильные тест-объекты суспензией тест-микроорганизмов, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл, из расчета 20 мл на 10 тест-объектов. Через 30 мин. тест-объекты закладывают в бязевые мешочки размером 5×8 см (по 2 штамма в каждый), которые закрывают в виде конверта.

Раствор испытываемого ДС на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до 50±1°С готовят из расчета 5 л на 1 кг белья. Ветошь, имитирующую белье, поштучно погружают в емкость с раствором испытываемого ДС так, чтобы между слоями ткани не образовывалось воздушных прослоек, препятствующих процессу дезинфекции. Одновременно между слоями белья распределяют (сверху, в середине и внизу) мешочки с контаминированными тест-объектами. Через заданное время мешочки извлекают одновременно из трех слоев. Тест-объекты вынимают из мешочка стерильным пинцетом, помещают на 5 мин. в емкость с раствором соответствующего нейтрализатора, затем переносят в стерильную питьевую воду и высевают в бульон Хоттингера (рН 7,2). Посевы инкубируют при 37±1°С в течение 48 часов. Предварительный учет результатов проводят через 48 часов, а окончательный – через 21 сутки. В контрольных опытах белье погружают в стерильную питьевую воду. Мешочки с тестами закладывают так же, как и в опыте. При получении 100% гибели тест-микроорганизма в опытах по обеззараживанию белья без белковых загрязнений переходят к опытам по обеззараживанию белья, загрязненного выделениями.

Для определения эффективности ДС при обеззараживании белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани, загрязненных кровью, выделениями (фекалии, мокрота, моча и др.), в лабораторных условиях используют бязевые тест-объекты, которые контаминируют из расчета 30 мл суспензии на 10 тест-объектов тестовой суспензией спор тест-микроорганизма с добавлением 40% инактивированной сыворотки (6 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор тест-микроорганизма смешивают с 4 мл инактивированной сыворотки) или 40% фекальной эмульсии (6 мл суспензии спор тест-микроорганизма смешивают с 4 мл 40% фекальной эмульсии). Для приготовления фекальной эмульсии 8 г фекалий растирают в ступке с 20 мл воды. Количество суспензии спор тест-микроорганизма, содержащей сыворотку или фекалии, готовят из расчета 30 мл на 10 тест-объектов. Контаминированные тест-объекты подсушивают в термостате при 37±1°С в течение 20-25 мин. или 1,5-2 часов при комнатной температуре до полного высыхания. Методика проведения эксперимента аналогична опытам с чистым бельем.

Критерием эффективности ДС при обеззараживании белья, одежды, спецодежды и других объектов из тканей является 100% гибель спор тест-микроорганизмов на тест-объектах.

При изучении эффективности обеззараживания изделий из синтетических тканей (капрон, ацетат, периацетат, лавсан и др.) используют тест-объекты из этих тканей размером 5×5 см, так как микроорганизмы не проникают в структуру этих тканей и смываемость их в 2 раза больше, чем с батистовых тест-объектов.

1.7.4.5.1 Исследование спороцидной эффективности камерного метода обеззараживания

Камерный метод используют для обеззараживания одежды, обуви, постельных принадлежностей, мягких игрушек и др.

В качестве тест-микроорганизма используют B. cereus в виде суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл, которой контаминируют тест-объекты из батиста, бязи и других материалов, соответствующих обеззараживаемым объектам. Контаминированные тест-объекты закладывают в стерильные конверты из хлопчатобумажной ткани (по 2 тест-объекта в конверт). Пронумерованные тест-объекты помещают в хлопчатобумажные мешочки с максимальными термометрами и размещают в толще объектов в контрольные точки камеры на трех уровнях.

После дезинфекции мешочки извлекают из камеры и записывают показания максимальных термометров, а тест-объекты помещают в пробирки с 5 мл питательного бульона.

Инкубирование посевов с тест-объектами проводят при температуре 37±1°С в течение 21 суток при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ). Предварительный учет результатов проводят через 24-72 часа, окончательный – через 21 сутки. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение выросшей культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве контроля используют контаминированные тест-объекты, которые не помещали в камеру. Контрольные посевы выращивают с использованием тех же питательных сред, что и для опытных тест-образцов. Контрольные посевы и среду контролируют

аналогично тест-объектам, которые обрабатывали в камере. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Контролем эффективности режима обеззараживания вещей в испытуемых дезинфекционных камерах является 100% гибель спор тест-микроорганизмов.

1.7.4.6 Исследование спороцидной эффективности ДС при обеззараживание рук в резиновых перчатках

В качестве тест-микроорганизма используют лиофильно-высушенную сибиреязвенную сухую вакцину СТИ-1. Готовят споровую суспензию путем внесения в ампулу с сухой вакциной 2 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения сухой вакцины получают суспензию, содержащую $(1,0\text{-}5,0)\cdot10^8$ спор/мл, которую разводят до содержания 10^3, 10^5 и 10^7 спор/мл.

Для устранения посторонней микрофлоры руки, включая запястья и предплечья, испытатели тщательно моют с мылом в теплой проточной воде, затем протирают стерильной марлевой салфеткой и одевают резиновые перчатки.

Поверхность резиновых перчаток, надетых на руки испытателей-добровольцев, контаминируют путем тщательного растирания 1 мл споровой суспензии тремя вышеуказанными разведениями (каждое разведение на одного испытателя). После подсыхания микробной взвеси для контроля исходной обсемененности с поверхности резиновой перчатки тыльной стороны кисти делают смыв стерильной марлевой салфеткой размером 5×5 см, смоченной стерильной питьевой водой. Затем салфетку помещают в пробирку с 10 мл стерильной питьевой

воды с бусами и встряхивают 10 мин. Полученный смыв высевают по 0,5 мл в селективную жидкую питательную среду (9,5 мл) в пробирке.

Для обеззараживания поверхности перчаток в сжатую ладонь руки в печатке испытателю-добровольцу наносят 2,5 мл исследуемого спороцидного ДС.

Затем он в течение 10-15 сек. протирает этой порцией дезинфицирующего раствора поверхность перчаток обеих рук, совершая движения рук, которые выполняют при обработке кожи рук антисептиком. После этого такую же операцию проводят, нанося 2.5 мл дезинфицирующего раствора на ладонь второй руки и засекают по секундомеру начало экспозиции.

После 5-минутной экспозиции делают смыв марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной соответствующим ДС нейтрализатором, предварительно проверенным на эффективность нейтрализации и статического действия на споры. Салфетку помещают в пробирку с 10 мл стерильного нейтрализатора на 10 мин. Затем салфетку переносят стерильным пинцетом в пробирку с 10 мл стерильной питьевой воды с бусами, встряхивают пробирку 10 мин. в шейкере. Из полученного смыва делают посев по 0,5 мл на селективные жидкие питательные среды в пробирках (не менее 3 пробирок на пробу).

Эффективными считают режим применения ДС, обеспечивающий 100% гибель исследованного спор вакцины СТИ-1 на резиновых перчатках, защищающих кожу рук.

1.7.4.7 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воды

Методы распространяются на изучение спороцидной эффективности химических ДС при обеззараживании питьевой и

природной воды, содержащей или подозрительной на содержание возбудителя сибирской язвы.

При определении спороцидной эффективности ДС в качестве тест-объектов используют водопроводную (дехлорированную), колодезную, речную и др. воды. Водопроводную воду дехлорируют нагреванием до температуры 50-60°С с последующим выдерживанием в течение одних суток при комнатной температуре. Определяют физико-химические свойства питьевой дехлорированной воды и образцов природных вод. Кроме того, в последних определяют микробиологические показатели (общее микробное число и общее количество колиформных бактерий).

В качестве тест-микроорганизмов для контаминации исследуемых проб воды используют споровую культуру B. cereus или сибиреязвенную живую сухую вакцину СТИ-1 для людей. Вирулентную культуру возбудителя сибирской язвы в этих целях использовать не разрешается из-за сложности соблюдения противоэпидемических мероприятий.

Контаминацию изучаемых образцов воды проводят путем внесения споровой культуры B. cereus в виде суспензии, содержащей 10^8 спор/мл, а сибиреязвенную живую сухую вакцину СТИ-1 – в виде суспензии, приготовленной разбавлением содержимого одной ампулы вакцины в 10 мл стерильного физиологического раствора или стерильной водопроводной воды до содержания 10^8-10^9 спор/мл.

При постановке экспериментов исходную воду наливают в емкости с нижним тубусом объемом 5-10 л и вносят в воду вышеуказанные тест-микроорганизмы из расчета 10^5-10^6 спор/л. После тщательного перемешивания определяют концентрацию исходной контаминации воды. Для этого из емкостей отбирают 1-3 пробы воды объемом 3-5 мл. Из каждой пробы делают по 3-4 последовательных

десятикратных разведения стерильным физиологическим раствором или стерильной питьевой водой, в которых затем определяют количество тест-микроорганизма в 1 мл пробы воды методом мембранной фильтрации.

Метод основан на концентрировании микроорганизмов из определенного объема анализируемой воды путем фильтрования через мембранные фильтры, выращивании посевов при температуре 37±1°С на плотной питательной среде, и подсчете количества тест-микроорганизмов в единице объема воды.

Используют мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества. Мембранные фильтры готовят к анализу в соответствии с указаниями производителя.

Фильтрование воды проводят с помощью прибора для мембранной фильтрации. Стакан (воронку) и столик прибора перед анализом воды завертывают в бумагу и стерилизуют в паровом или воздушном стерилизаторе. На нижнюю часть прибора (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр; прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой); закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора; при соблюдении правил стерильности наливают необходимый объем исследуемой воды и создают вакуум в приемном сосуде.

Фильтруют вначале меньшие, а затем большие количества воды через один фильтровальный прибор, каждый раз сменяя мембранный фильтр.

После окончания фильтрования определенного количества воды стакан (воронку) снимают, а фильтр осторожно приподнимают за край

фламбированным пинцетом при сохранении вакуума для удаления излишней влаги на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая, на поверхность казеинового или мясопептонного агара в чашках Петри, так чтобы между средой и фильтром не было пузырьков воздуха. Под каждым фильтром на обратной стороне дна чашки Петри делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева и номера пробы. Посевы инкубируют при температуре 37±1°С в течение 24-48 ч.

По окончании инкубации учитывают количество колоний тест-микроорганизма, выросших на фильтрах, и определяют их концентрацию в 1 л воды по формуле:

$$C = \frac{k}{v} \times N \times 100,$$

где

С – количество спор, содержавшихся в 1 л воды;

k – кратность разведения;

v – посеянный объем воды в мл;

N – среднее арифметическое числа колоний, выросших на мембранных фильтрах при посеве одинаковых разведений.

Результат анализа при определении числа спор в исходной воде выражается числом КОЕ в 1 л воды.

Для определения эффективности обеззараживания спороцидным ДС в емкость с водой, контаминированной спорами тест-микроорганизмов, вносят ДС в изучаемых концентрациях, воду тщательно перемешивают. Через заданные промежутки времени при соблюдении условий стерильности отбирают пробы воды объемом 1 л в стерильные флаконы с внесенным в них стерильным нейтрализатором,

подобранным в концентрации, обеспечивающей нейтрализацию действующего агента изучаемого ДС.

В обеззараженной воде определяют число непогибших спор B. cereus или сибиреязвенной живой вакцины СТИ-1 для людей методом мембранной фильтрации. Пробы обеззараженной воды с нейтрализатором должны быть исследованы не позднее, чем через 1 ч после их отбора.

На начальных этапах изучения эффективности обеззараживания воды анализируют не менее двух проб, отличающихся по объему в 10 раз, и выбранных так, чтобы на одном фильтре выросло не более 300 колоний. На одну чашку Петри можно поместить 3-4 фильтра с условием, чтобы они не соприкасались друг с другом. При анализе обеззараженной воды на конечных этапах обеззараживания необходимо исследовать объем не менее 1 л, профильтровывая это количество не менее чем через 3-4 мембранных фильтра.

Посевы инкубируют как указано выше. Учитывают общее количество выросших колоний на фильтрах после фильтрования 1 л воды. Результат анализа выражают числом спор в 1 л обеззараженной воды.

Статистическая обработка результатов микробиологических анализов по оценке эффективности средств обеззараживания воды имеет целью исключить случайные ошибки, оценить отклонения результатов анализа от действительной величины и дать искомые результаты с заданной вероятностью.

В процессе статистической обработки результатов экспериментальных исследований рекомендуется использовать при определении концентрации контаминации исходной воды тест-микроорганизмами и на промежуточных этапах обработки среднюю

арифметическую ($\overline{X}$), а при оценке эффективности обеззараживания на завершающем этапе – медианное значение (Me).

Количество проб n, необходимое для действительной оценки результатов микробиологических исследований, определяют по формуле:

$$n = \left(\frac{\sigma t_p}{I_p} \right)^2$$

где

σ – квадратичное отклонение;

I_p – максимально допустимое отклонение от средней, оцениваемое с вероятностью p=0,99;

t_p – коэффициент, зависящий от числа опытов (не менее 10), по которым определяется величина σ.

Если σ определяется по данным 16 опытов, то $t_{0,99}$=2,7. Число проб для оценки содержания микроорганизмов в обеззараженной воде должно быть не менее 16.

Оценка результатов микробиологических анализов проводят для заданной вероятности 0,99, соответственно, для того же значения определяют и доверительный интервал средней арифметической и медианы.

Доверительный интервал средней арифметической определяют по данным величины квадратичного отклонения σ и средней ошибки σ_x.

Величину квадратичного отклонения вычисляют по формуле;

$$\sigma = \frac{\Sigma (x-\overline{X})^2}{n-1}$$

где $\Sigma(x-\overline{X})^2$ – сумма квадратов отклонений измерений от средней арифметической, а n – число отдельных измерений.

Среднюю ошибку вычисляется по формуле:

$$\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Вероятности 0,99 отвечает доверительный интервал I, вычисляемый по формуле: $I_{0,99} \pm 2,7\sigma_x$

Тогда доверительное значение количества микроорганизмов в пробе с вероятностью 0,99 находится в интервале $\overline{X} \pm 2.7\sigma_x$.

Доверительный интервал медианы для требуемого уровня вероятности 0,99 определяют в зависимости от числа проведенных опытов по таблице, в которой указаны номера опытов, результаты которых учитывают в качестве граничных значений доверительного интервала медианы.

Для пользования таблицей необходимо, чтобы результаты опытов были расположены и пронумерованы в порядке возрастания величин.

Критерием оценки эффективности ДС при обеззараживании воды является отсутствие тест-микроорганизмов в 1 л воды.

Таблица 1.11.

Граничные значения доверительного интервала медиа

Число опытов	Нижняя граница	Верхняя граница		**Число опытов**	Нижняя граница	Верхняя граница
7	-	-		**29**	8	22
8	1	8		**30**	8	23
9	1	9		**31**	8	24
10	1	10		**32**	9	24
11	1	11		**33**	9	25
12	2	11		**34**	10	25
13	2	12		**35**	10	26
14	2	13		**36**	10	27
15	3	13		**37**	11	27
16	3	14		**38**	11	28
17	3	15		**39**	12	28
18	4	15		**40**	12	29
19	4	16		**41**	12	30

20	4	17		**42**	13	30
21	5	17		**43**	13	31
22	5	18		**44**	14	31
23	5	19		**45**	14	32
24	6	19		**46**	14	33
25	6	20		**47**	15	33
26	7	20		**48**	15	34
27	7	21		**49**	16	34
28	7	22		**50**	16	35

1.7.4.8 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, фекалии, мокрота), биологических жидкостей (крови)

Обеззараживание мочи.

В качестве тест-объекта используют мочу, которую разливают в колбы или пробирки по 8 мл, добавляют по 1 мл споровой суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл тест-микроорганизма.

Растворы испытываемого ДС готовят в концентрациях, обеспечивающих спороцидную активность при испытании его на батистовых тест-объектах с белковой защитой.

Испытуемые концентрации растворов ДС добавляют к моче в равном или двойном объеме. Отмечают время контакта и через интервалы 15, 30, 60 мин. пипеткой берут указанную смесь в количестве 1 мл и переносят в пробирки с 5 мл питательной среды (бульон Хоттингера, pH 7,2) и соответствующего нейтрализатора. После тщательного смешивания 1 мл жидкости из первой пробирки с бульоном переносят во вторую пробирку с бульоном (5 мл) и затем засевают по 0,1 мл на агар Хоттингера (pH 7,2) в чашках Петри, как из первой, так и из второй пробирки. Чашки Петри инкубируют в термостате при 37±1°С.

Контролем служат аналогично поставленные опыты только с добавлением к моче не дезинфицирующего раствора, а воды.

Ориентировочный учет результатов проводят через 1 сутки, предварительный – через 5-7 суток, окончательный – 21 сутки. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100%. Окончательное заключение об эффективности ДС делают на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами.

Эффективным считают средство и режим его применения, обеспечивающие 100% гибель спор тест-микроорганизмов.

Обеззараживание фекалий.

При разработке режимов обеззараживания фекалий учитывают соотношение дезинфицирующего средства к обеззараживаемой массе, время обработки, температуру, консистенцию обеззараживаемых выделений, степень гомогенизации в процессе обеззараживания.

Исследования проводят в два этапа. На первом этапе в качестве тест-объекта используют 20% эмульсию фекалий, на втором – оформленные фекалии.

Для приготовления 20% эмульсии 20 г фекалий растирают в ступке и добавляют 80 мл воды; полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, стерилизуют в автоклаве, разливают пипеткой в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл. Опыты начинают с концентрации, вызывающей гибель тест-микроорганизма в моче с белком через 30 мин. Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным объемом дезинфицирующего раствора,

через 30, 60, 120 мин. отбирают пробы и производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через 48 часов.

При положительных результатах проводят опыты с большим количеством оформленных фекалий (200-250 г). Для этого помещают их в сосуд, заливают дезинфицирующим раствором или засыпают сухими дезинфектантами в равном или двойном количестве по отношению к весу фекалий, определяют визуально происходит ли гомогенизация фекалий. Затем небольшую часть каловых масс размешивают стеклянной палочкой с жидкостью, а остальную массу оставляют в виде небольших комочков. Через определенные промежутки времени (например, 30, 60 мин.) проводят посев.

Посев жидкой части фекалий высевают так же, как и мочу. Плотные же части (комочки) забирают бактериологической петлей и помещают в 5 мл питательной среды с соответствующим нейтрализатором, растерев их о края пробирки и тщательно перемешав. Затем стерильной пипеткой переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, тоже содержащую бульон Хоттингера (pH 7,2). Как из первой, так и из второй пробирки производят посев на агар Хоттингера в чашках Петри (не менее, чем в три чашки по 0,1 мл). Окончательный результат учитывают через семь суток, а предварительный – через 24 часа.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением вместо дезинфицирующего раствора воды. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100%. Судят об эффективности исследуемого вещества на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами. Эффективным считают средство и режим его применения, обеспечивающие 100% гибель спор тест-микроорганизмов в обеззараживаемом материале.

Обеззараживание крови и мокроты.

В качестве тест-объектов при оценке спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания крови, используют кровь, а мокроты - куриный белок. В качестве тест-микроорганизма используют споры B.cereus. Для контаминации тест-объектов тест-микроорганизмом к 9 мл 40% крови или 50% куриного белка добавляют по 1 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл, перемешивают и разливают по 1 мл в стерильные флаконы. Затем во флаконы засыпают или наливают исследуемое ДС в объемных (5%, 10% и т.д.) соотношениях к объему исследуемого материала. Через определенные промежутки времени (1 час, 3 часа и т.д.) с помощью стерильной бактериологической петли производят отбор пробы смеси и переносят ее в 5 мл селективной жидкой питательной среды с соответствующим (заранее проверенным по эффективности нейтрализации ДС) нейтрализатором для нейтрализации остаточного действия ДС на споры тест-микроорганизма. По истечении 5 мин. экспозиции из этой пробирки с помощью пипетки производят высев по 0,2 мл исследуемой пробы на агар Хоттингера (pH 7,2) в чашках Петри. Пробирки и чашки с посевами инкубируют при 37±1°С.

Окончательный результат роста тест-микроорганизмов на чашках учитывают на 3-7 суток, а предварительный – через 24 часа, а в пробирках, соответственно, через 21 сутки и 24-48 часов.

Эффективным считают средство, обеспечивающее 100% гибель спор тест-микроорганизма в обеззараживаемом материале.

1.7.4.9 Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов

При изучении спороцидной активности ДС с целью разработки режимов обеззараживания медицинских отходов используют тест-объекты из резин, пластмасс, текстильных материалов, стекла, металлов. Для приготовления тест-объектов стерильные одноразовые медицинские изделия (бинты, ватные тампоны, фрагменты систем для переливания крови и лекарственных препаратов, катетеры, шпатели, шприцы, иглы перчатки, одноразовое белье, салфетки, пипетки, трубки и пр.) измельчают и погружают в суспензию, содержащую $2 \cdot 10^9$ спор/мл B. cereus с 40% инактивированной лошадиной сывороткой или сывороткой крупного рогатого скота. После достаточного пропитывания тест-объекты извлекают в сухую стерильную емкость и подсушивают в термостате в течение 20 мин. или при комнатной температуре при 18-20°С и относительной влажности воздуха 50-60% в течение 1 часа.

Контаминированные тест-объекты погружают в емкость с испытуемым дезинфицирующим раствором, так, чтобы он полностью закрывал их. Контроль эффективности обеззараживания тест-объектов проводят через каждые 15-30 мин. в течение времени от 30 до 360 мин. Для этого тест-объекты из различных материалов (по два каждого наименования) извлекают из дезинфицирующего раствора, промывают в растворе соответствующего нейтрализатора и помещают в пробирки с жидкой питательной средой. Контрольные тест-объекты погружают на срок максимальной экспозиции в стерильную питьевую воду, а затем в жидкую питательную среду. Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре 37±1°С. Учет результатов проводят в течение 21 суток.

Критерий эффективности обеззараживания медицинских отходов – 100% гибель спор тест-микроорганизма на тест-объектах, обработанных ДС.

1.7.5 Методы исследования и оценки спороцидной активности ДС при использовании в качестве тест-микроорганизмов вирулентных штаммов B. Anthracis

При использовании в качестве тест-микроорганизмов спор непатогенных штаммов (B. cereus, B. subtilis, сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 и др.) спороцидную активность ДС определяют только культуральным методом, а при использовании вирулентных тест-микроорганизмов B. anthracis – одновременно культуральным и биологическим. При культуральном методе результаты исследований оценивают по росту тест-микроорганизмов на питательных средах до и после действия ДС, а при биологическом – по гибели белых мышей от возбудителя сибирской язвы.

Трудность соблюдения противоэпидемических мероприятий при использовании вирулентных штаммов B. anthracis не позволяет использовать его для определения эффективности обеззараживания многих объектов (воды, воздуха, камерного метода обеззараживания вещей и др.), поэтому для изучения спороцидной активности и эффективности ДС при обеззараживании всех объектов, являющихся факторами передачи возбудителя сибирской язвы, рекомендуется использовать непатогенные тест-микроорганизмы.

После установления спороцидной активности ДС культуральным методом, применяя вышеуказанные непатогенные тест-микроорганизмы, целесообразно проводить исследования культуральным и биологическим методами, используя B. anthracis, так

как биологический метод позволяет отличить спороцидное действие ДС от споростатического, при отсутствии полной нейтрализации действующего вещества ДС химическими нейтрализаторами.

Спороцидная эффективность ДС с использованием спор вирулентных штаммов B. anthracis может быть изучена на следующих контаминированных тест-объектах: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств; изделий медицинского назначения; предметов ухода за больными; посуды, включая столовую, лабораторную и из-под выделений; белья, спецодежды и других объектов из тканей; изделий из резины, в том числе перчаток, сапог, фартуков и др.; выделений (фекалий, мочи), медицинских отходов.

Методика изучения спороцидной активности ДС при работе с B. anthracis. В качестве тест-микроорганизмов используют вирулентные штаммы B. anthracis (штамм. 81/1 и 27, имеющие плазмиды pX01+ и pX02+), единичные клетки которых при внутрибрюшинном введении вызывают гибель биопробных животных. Характеристика этих штаммов, требования по устойчивости, питательные среды для культивирования приведены в п. 5.8.1. и приложениях 1 и 2.

Методы получения суспензии спор вирулентных штаммов B. anthracis, обеспечение стандартных условий проведения исследований спороцидной активности ДС и их субстанций, исследования спороцидной активности и эффективности при разработке режимов применения ДС для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме, изложены в п. 1.8.1.

При контроле спороцидного действия ДС на споры вирулентных штаммов B. anthracis действующее вещество необходимо сразу после окончания экспозиции нейтрализовать соответствующим нейтрализатором с последующим высевом на твердые и/или жидкие питательные среды (как изложено в предыдущих разделах).

Одновременно часть пробы исследуют при постановке биопробы, используя белых мышей весом 10-12 г в количестве 6 штук на постановку одной биопробы. Подготовленную и использованную пробу вводят внутрибрюшинно белым мышам в объеме 0,2 мл каждой. Параллельно проводят контрольные заражения животных раствором нейтрализатора (контроль отсутствия губительного действия нейтрализатора на белых мышей) и суспензией интактных (не подвергшихся воздействию ДС) спор вирулентных штаммов B. anthracis в заражающих дозах (контроль вирулентного действия использованной суспензии спор возбудителя). Количество животных в контрольных группах должно быть не менее 3.

Наблюдения за животными проводят в течение 48-96 часов; павших и выживших мышей вскрывают, делают посев из органов животных на агар Хоттингера (pH 7,0) для выделения возбудителя сибирской язвы.

Посевы подготовленных проб из органов животных инкубируют при температуре 37±1°C в течение 48-96 часов. Идентифицируют и подсчитывают выросшие колонии B. anthracis.

Эффективным считается ДС, после воздействия которого в установленных режимах не обнаружены жизнеспособные клетки вирулентных тест-микроорганизмов B. anthracis при исследовании культуральным методом и нет павших животных в опытной группе, а в

контрольных пробах – высев из органов животных патогенного тест-микроорганизма (B. anthracis).

1.7.6. Методы исследования и оценки спороцидной эффективности стерилизующих средств, предназначенных для стерилизации медицинских изделий, включая эндоскопы

1.7.6.1 Исследование спороцидной эффективности водяного насыщенного пара под избыточным давлением, предназначенного для стерилизации медицинских изделий

Метод предназначен для исследования эффективности стерилизации медицинских изделий водяным насыщенным паром под избыточным давлением, в том числе при испытаниях новых паровых стерилизаторов. Исследование проводят в паровых стерилизаторах при загруженной стерилизационной камере.

Для контроля эффективности стерилизации медицинских изделий водяным насыщенным паром под избыточным давлением используют тест-объекты и тест изделия, контаминированные суспензией спор тест-микроорганизма G. stearothermophilus, а также биологические индикаторы, разрешенные к применению в установленном порядке, при паровом методе стерилизации в Российской Федерации.

В качестве тест-объектов применяют тест-образцы (0,5×1.0 см), нарезанные из резин, латекса, бязи, перевязочных материалов и др. Подготовленные тест-объекты стерилизуют паровым или воздушным методом (тест-объекты из резин, латекса, бязи, перевязочных материалов раскладывают в чашки Петри).

Из исходной суспензии спор G. stearothermophilus готовят суспензию, содержащую от $5{,}0\times10^{7}$ до $2{,}5\times10^{8}$ спор в 1 мл для контаминации тест-объектов. Стерильные тест-объекты контаминируют этой суспензией из расчета $(1{,}0\text{-}5{,}0)\times10^{6}$ спор в объект путем нанесения

на каждый тест-объект с помощью дозатора переменного объема 0,02 мл подготовленной суспензии. Контаминированные тест-объекты высушивают в термостате при температуре 37±1°С в течение 24 часов и закладывают в бумажные и комбинированные (полимерная пленка + бумага) пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов для парового метода стерилизации в Российской Федерации.

В качестве тест-изделий используют медицинские изделия из коррозионностойких металлов (хирургические, стоматологические, гинекологические инструменты – корнцанги, зажимы, щипцы, пинцеты), стекла (пробирки, микропипетки), резин (катетеры, зонды, трубки), пластмасс (наконечники, лотки), которые предварительно стерилизую паровым методом, а затем контаминируют исходной суспензией спор тест-микроорганизма G. stearothermophilius (плотность контаминации 10^6 спор на тест-изделие) и упаковывают в бумажные пакеты или листовые материалы, или бязь – при размещении изделий в коробках стерилизационных; в комбинированные пакеты – при размещении изделий в корзинах загрузочных.

Упаковки с контаминированными тест-объектами/тест-изделиями, а также биологическими индикаторами нумеруют и размещают вместе с максимальными термометрами в контрольные точки стерилизационной камеры вне коробок стерилизационных/корзин загрузочных у двери и задней стенки и в коробки стерилизационные/корзины загрузочные между изделиями.

Тест-объекты размещают между изделиями, применяемыми в качестве имитаторов загрузки, а также в изделиях – перчатках, халатах; тест-изделия – между изделиями, использующимися в качестве имитаторов загрузки.

Плотность загрузки коробок стерилизационных изделиями из резин и текстиля должна соответствовать нормам, приведенным в «Методических указаниях по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначении» (МУ № 287-113 от 30.12.1998). Указанные изделия, а также изделия из металлов и стекла в коробках стерилизационных и корзинах загрузочных, распределяют равномерно; пакеты заполняют изделиями не более, чем на ¾ объема.

Стерилизатор включают и после его выхода на режим (достижение номинального значения давления/температуры стерилизации) начинают отсчет времени выдержки. По окончании времени выдержки тест-объекты и тест-изделия вынимают из стерилизатора.

Тест-объекты из резин, латекса, бязи, перевязочных пинцетом, который обжигают в пламени, помещают в бактериологические пробирки с 5 мл питательного бульона (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ).

Для контроля стерильности крупных тест-изделий, подвергнутых обработке в стерилизаторе, осуществляют посев в питательный бульон марлевых салфеток (размер 5×5 см), с помощью которых производят отбор проб с изделий методом смыва. Салфетки предварительно увлажняют стерильным физиологическим раствором (0,9% раствор натрия хлорида). У изделий, имеющих каналы, через последние пропускают физиологический раствор, после чего его засевают в питательный бульон.

Инкубирование посевов проводят при температуре 55±1°С в течение 7 суток при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ).

При наличии роста микроорганизмов производят сравнение выделенной культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве средств контроля используют тест-объекты и тест-изделия, которые не подвергают обработке в стерилизаторе. Посевы контрольных тест-объектов и тест-изделий или смывы с них в питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляют аналогично тест-объектам/тест-изделиям, которые подвергали обработке в стерилизаторе.

Аналогичную методологию исследования применяют и при отработке эффективных режимов стерилизации медицинских изделий во вновь разрабатываемых паровых стерилизаторах. Для этого эксперименты проводят при различном времени выдержки и размещении тест-объектов/тест-изделий и максимальных термометров в различных точках стерилизационной камеры. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на (каждый режим) каждое время обработки.

Критерий эффективности водяного насыщенного пара под избыточным давлением для стерилизации медицинских изделий является 100% гибель спор G. stearothermophilius на тест-объектах и тест-изделиях (тест-объектах/тест-изделиях) из различных материалов, обработанных в исследуемом аппарате.

1.7.6.2 Исследование спороцидной эффективности сухого горячего воздуха, предназначенного для стерилизации медицинских изделий

Метод предназначен для исследования эффективности стерилизации медицинских изделий сухим горячим воздухом, в том числе при испытаниях новых воздушных стерилизаторов.

Исследование проводят в воздушных стерилизаторах при загруженной стерилизационной камере.

Для контроля эффективности стерилизации медицинских изделий сухим горячим воздухом в качестве тест-изделий используют пробирки типа П2-21-200, ГОСТ-25336-82 (для стерилизаторов объемом стерилизационной камеры до 20 $дм^3$ включительно) и чашки биологические Петри с крышками низкие ЧБН-1-100 по ГОСТ-25336-82 (для стерилизаторов объемом стерилизационной камеры 40 дм3 и более). Предварительно их стерилизуют паровым или воздушным методом и контаминируют суспензией спор тест-микроорганизма B. licheniformis. Кроме этого, используют биологические индикаторы, разрешенные к применению в установленном порядке, при воздушном методе стерилизации в Российской Федерации.

Из исходной суспензии спор B. licheniformis готовят суспензию, содержащую от 10^8 до 10^9 спор в 1 мл для контаминации тест-изделий из расчета 10^6 спор в/на тест-изделие, что достигается нанесением в/на каждое тест-изделие с помощью дозатора переменного объема 0,02 мл подготовленной суспензии.

Контаминированные тест-изделия высушивают в термостате при температуре 37±1°С в течение 24 часов, затем их и имитаторы загрузки (пробирки и чашки Петри) упаковывают в листовую бумагу, в бумажные или полимерные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов для воздушного метода стерилизации в Российской Федерации (пробирки по 1 штамм, чашки Петри – по 2 штамм в упаковке).

Упаковки с тест-изделиями, а также биологические индикаторы нумеруют и размещают на загрузочные полки в места размещения датчиков температуры (не менее 5 точек). Имитаторы загрузки

равномерно размещают на загрузочные полки стерилизатора (количество имитаторов загрузки, в том числе тест-изделий) в зависимости от объема стерилизационной камеры составляет: 20 $дм^3$ – 40 пробирок; 40 $дм^3$ – 40 чашек Петри; 80 $дм^3$ – 80 чашек Петри; 160 $дм^3$ – 160 чашек Петри; 320 $дм^3$ – 320 чашек Петри; 640 $дм^3$ – 640 чашек Петри.

Стерилизатор включают и после достижения номинального значения температуры стерилизации начинают отсчет времени стерилизационной выдержки. По окончании времени стерилизационной выдержки тест-изделия и биологические индикаторы вынимают из стерилизатора. Пробирки заливают питательным бульоном (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ); чашки Петри – питательным агаром (агар Хоттингера, МПА, СПА).

Инкубирование тест-изделий проводят при температуре 37±1°С в течение 21 суток при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ); чашки Петри инкубируют в течение 7 суток. Учет результатов проводят путем визуального осмотра.

Отсутствие помутнения питательного бульона, роста микроорганизмов на чашке Петри указывает на гибель спор в/на тест-изделиях. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение выделенной культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве средств контроля используют тест-изделия, которые не подвергают обработке в стерилизаторе. Посевы контрольных тест-изделий или смывы с них в питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляют аналогично тест-изделиям, которые подвергали обработке в стерилизаторе.

Аналогичную методологию исследования применяют при отработке эффективных режимов стерилизации медицинских изделий в

стерилизаторах разных марок, в том числе во вновь разрабатываемых стерилизаторах. Для этого эксперименты проводят при различном времени выдержки и размещении тест-объектов и тест-изделий, датчиков температуры в различных точках стерилизационной камеры. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Критерием эффективности сухого горячего воздуха для стерилизации медицинских изделий является 100% гибель спор B. licheniformis на обработанных в исследуемом аппарате тест-объектах и тест изделиях из различных материалов.

1.7.6.3. Исследования спороцидной эффективности растворов химических СС, предназначенных для стерилизации медицинских изделий

При исследовании и оценке спороцидной эффективности растворов стерилизующих средств, предназначенных для стерилизации медицинских изделий используют B. cereus и B. subtilis с определенной устойчивостью (табл. 5.8.).

Культивирование спорообразующих тест-микроорганизмов, устойчивых к действующему веществу, входящему в состав изучаемого стерилизующего средства, приготовление суспензии спор (п. 5.8.1.).

В качестве тест-носителей используют простерилизованные тест-образцы из различных материалов (пластмасс, резин на основе натурального и силиконового каучука, стекла, металлов), имитирующие медицинское изделие, а также сами медицинские изделия (катетеры, боры и зеркала стоматологические, зажимы, эндоскопы). Для контаминации тест-носителей используют споры тест-микроорганизма,

обладающего наибольшей устойчивостью к раствору данного химического агента.

При испытании раствора средства на основе ранее не изучавшегося для этой цели действующего вещества, подбирают устойчивый спорообразующий микроорганизм, споры которого может быть использован в качестве тест-микроорганизма (п. 5.8.3.).

С целью контаминации тест-изделий, на них капельным способом наносят суспензию спор тест-микроорганизма (из расчета 106 спор на тест-изделие). Тест-микроорганизмы должны быть нанесены на наиболее сложные по конструкции и труднодоступные участки тест-изделий: в каналы, рабочие и замковые части. После этого тест-изделия подсушивают в течение 60 мин. при температуре 37±1°С.

При проведении экспериментов изделия погружают в рабочие растворы таким образом, чтобы раствор полностью покрыл изделия (толщина слоя раствора над поверхностью изделий должна быть не менее 1 см) и заполнил все полости и каналы без воздушных пробок. Инструментами, имеющими замковые части, необходимо сделать несколько рабочих движений для лучшего проникновения раствора средства в области замка. При исследованиях используют растворы, имеющие комнатную температуру 18-20°С. При испытании растворов альдегидсодержащих средств температура раствора должна составлять плюс 20-22°С. В случае необходимости (для повышения активности растворов) готовят рабочие растворы умеренно-повышенной температуры плюс 50±1°С. Одновременно не менее чем по два тест-объекта помещают в воду, а также в раствор нейтрализатора, на время, соответствующее максимальному исследуемому времени выдержки в изучаемом растворе средства.

Изучение эффективности средства и его рабочих растворов в зависимости от сроков хранения, а также (при необходимости) изучение эффективности рабочих растворов при многократном их использовании осуществляют аналогично указанному выше, применяя растворы средства с различными сроками хранения и кратностью использования для стерилизации.

При работе с тест-объектами и изделиями небольшого размера (боры) через определенные интервалы времени (в зависимости от состава средства) изделия извлекают из раствора исследуемого средства и последовательно осуществляют отмыв в растворе нейтрализатора и стерилизованной питьевой воде (по 5 мин.) с последующим прямым посевом на жидкие питательные среды с 0,5% глюкозы.

При работе с крупными изделиями для контроля стерильности подвергнутых обработке средством изделий осуществляют посев марлевых салфеток (размер 5×5 см), с помощью которых производят отбор проб с изделий методом смыва. Салфетки предварительно увлажняют раствором соответствующего нейтрализатора. При отмыве изделий, имеющих каналы, через последние пропускают раствор нейтрализатора. Если нейтрализатор для изучаемого средства не известен, целесообразно использовать универсальный нейтрализатор, проверенный на эффективность. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37±1°С в течение 14 суток.

Критерием эффективности является достижение 100% гибели спор тест-микроорганизма на всех тест-изделиях. При этом время действия раствора должно составлять не более 16 часов при температуре 18-20°С, и не более 3 часов при умеренно повышенной температуре (50°С).

1.7.7. Исследование и оценка спороцидной эффективности стерилизующих средств, предназначенных для исследования эффективности дезинфекции высокого уровня эндоскопов

Средства, предназначенные для дезинфекции высокого уровня эндоскопов, должны обеспечивать гибель на эндоскопах споровых форм микроорганизмов.

При изучении в качестве тест-объектов используют простерилизованные фрагменты канала гибкого эндоскопа в виде пластмассовых трубок длиной 20 мм и внутренним диаметром 2 мм. Перед проведением эксперимента тест-объекты подвергают очистке одним из средств, разрешенных для предстерилизационной очистки эндоскопов, а затем стерилизуют физическим (паровым) или химическим методом, рекомендованным для стерилизации гибких эндоскопов.

Простерилизованные тест-объекты искусственно контаминируют, нанося с помощью дозатора/микропипетки в центральную часть канала и на поверхности каждой трубки суспензию спор тест-микроорганизма (п. 1.8.4.4.2.) из расчета 106 спор на каждый тест-объект. Контаминированные тест-объекты подсушивают при температуре 37±1°С в течение 120 мин.

Обработку исследуемым средством осуществляют способом погружения в исследуемый раствор, имеющий температуру 18-20°С (для альдегидсодержащих средств – 20-22°С). При проведении экспериментов тест-изделия погружают в рабочие растворы таким образом, чтобы раствор полностью покрыл изделия (толщина слоя раствора над поверхностью изделий должна быть не менее 1 см) и заполнил все полости и каналы без воздушных пробок. Через определенные интервалы времени, зависящие от химического состава

средства (от 5 до 30 мин.), тест-изделия извлекают из раствора и помещают на 5 мин. в раствор соответствующего нейтрализатора, проверенного на эффективность. После этого тест-изделия переносят в пробирки с жидкой питательной средой (СПБ) с 0,5% глюкозы. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37±1°С в течение 21 суток. Предварительный учет результатов осуществляют через 48-72 часов, а окончательный – на 21 сутки. В качестве контроля используют тест-объекты, контаминированные, как указано выше, и помещенные в нейтрализатор и в водопроводную воду на время максимальной стерилизационной выдержки.

Эффективным считают режим (концентрация-время-температура), обеспечивающий 100% гибель спор тест-микроорганизма на всех тест-объектах при отсутствии его в нейтрализаторе. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более чем до 16 часов. Режим стерилизации, разработанный на имитаторах канала эндоскопа, проверяют при обработке эндоскопа, контаминированного тест-микроорганизмом.

Критерием эффективности является достижение 100% гибели спор тест-микроорганизма на всех тест-изделиях. При этом время действия раствора должно составлять не более 16 часов при температуре 18-20°С, и не более 3 часов при умеренно повышенной температуре 50±1°С.

1.7.9. Приложения

Приложение 1 (справочное)

Характеристика тест-микроорганизмов по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, присущим данному виду:

1. Bacillus cereus (штамм. 96).

Подвижная грамположительная палочка; размер, мкм: длина – 3-5, ширина – 1,2. Температура роста °С: минимальная – 10-20; оптимальная – 37±1, максимальная – 35-45. Споры размером 0,8×1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположенные центрально. Аэроб. На МПБ (pH 7,3±0,1) через 24 часа инкубирования образует крошковидный осадок и пристеночное кольцо, образует R-формы; на МПА (pH 7,3±0,1) – круглые, сухие, белые, выпуклые колонии с неровным краем, размером 3-5 мм; продукты расщепления глюкозы: кислота, ацетон, газ не образуется. Окрашиваемость вегетативных клеток по Граму, спор – по Цилю-Нильсону. По классификации патогенных для человека микроорганизмов относится к IV группе патогенности. Bacillus cereus используют для изучения и оценки спороцидной активности ДС, стерилизующих средств и их субстанций на основе кислородактивных и хлорактивных ДВ.

Тест-микроорганизм B. cereus хранится в музее Федерального бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

2. Geobacillus stearothermophilius (штамм ВКМ В-718).

Подвижная грамположительная термофильная палочка. Оптимальная температура роста 55±1°С, исключающая развитие других

широко распространенных микроорганизмов. Споры эллиптические, расположенные центрально. Аэроб. На МПБ (pH 7,3±0,1) через 24 часа инкубирования образует помутнение среды, на МПА (pH 7,3±0,1) – слабо выпуклые колонии диаметром 2-4 мм, с ровным краем. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Ферментирует глюкозу с образованием кислоты; не ферментирует арабинозу, ксилозу и маннин. Гидролизует казеин. Не расщепляет фенилаланин и тирозин. Непатогенен для человека и животных. G. stearothermophilius используют для исследования и оценки действия водяного насыщенного пара под избыточным давлением при стерилизации медицинских изделий.

Тест-микроорганизм G. Stearothermophilius хранится:

– в музее культур Федерального бюджетного государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18);

– музее культур Испытательного лабораторного центра (ГУП) «Московский городской центр дезинфекции» (129337, г. Москва, Ярославское шоссе, д. 9).

3. Bacillus licheniformis (штамм G ВКМ B-1711D).

Подвижная грамположительная палочка. Оптимальная температура роста 37±1°С. Споры эллиптические, расположенные центрально. Факультативный анаэроб. На МПБ (pH 7,3±0,1) через 24 часа инкубирования образует помутнение среды, на поверхности – сухую пленку; на МПА (7,3±0,1) – слабо выпуклые сухие колонии вытянутой звездчатой формы с неровными краями диаметром 4-6 мм, врастающие в питательную среду. Реакция Фогес-Проскауэра положительная. Ферментирует глюкозу с образованием кислоты и газа.

Редуцирует нитраты, образует газ в среде для нитрификации в в анаэробных условиях. Утилизирует пропинат. Гидролизует крахмал. Расщепляет аргинин. Не образует индол, лецитиназу, кислоту в лакмусовом молоке. Непатогенен для человека и животных. Bacillus licheniformis используют для исследования и оценки спороцидной активности сухого горячего воздуха при стерилизации медицинских изделий.

Тест-микроорганизм B. licheniformis хранится в:

– музее культур Федерального бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18);

– музее культур Испытательного лабораторного центра (ГУП) «Московский городской центр дезинфекции» (129337, г. Москва, Ярославское шоссе, д. 9).

4. Bacillus subtilis (штамм 7).

Подвижная грамположительная палочка размером 2-3×0,7-0,8 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 5-20, оптимальная – 37±1; максимальная – 45-55. Споры размером 0,8×1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Аэроб. На жидких питательных средах образует пленку серовато-белого цвета; на плотной питательной среде образует R-форму, складчатые колонии телесного цвета с изрезанными краями размером 3×5 мм, легко снимающиеся петлей. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон; газ не образует. Окрашиваемость вегетативных клеток по Граму, спор – по Цилю-Нильсону.

Bacillus subtilis используют для изучения и оценки спороцидной активности ДС, стерилизующих средств и их субстанций на основе альдегидактивных ДВ.

Тест-микроорганизм Bacillus subtilis хранится в музее культур Федерального бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

5. Вакцинный штамм B. anthracis СТИ-1 (pX01^{+}, pX01^{-}). Штамм СТИ-1 – это подвижная грамположительная палочка размером 3-5×1,0-1,2 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 15-20, оптимальная – 37±1; максимальная – 40. Споры размером 0,8×1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Анаэроб, на жидких питательных средах растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, не вызывает помутнения; на плотной питательной среде образует R-формы, серовато-белые с ворсистым краем («львиная грива»), колонии размером 3-5 мм. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон; газ не образует; не разлагает арабинозу, рамнозу, маннозу, галактозу, рафинозу, лактозу, гекулин, маннит, дульцид, сорбит, инозит; не обладает гемолитической, фосфатазной, лицитинозной активностью; лизируется специфическим сибиреязвенным фагом; дает положительную реакцию с люминсцирующей адсорбированной сибиреязвенной сывороткой, чувствительна к воздействию сибиреязвенного фага и пенициллина, не вызывает гемолиза эритроцитов; при посеве на 5% кровяной агар, не коагулирует яичный желток. Используют при изучении и оценке спороцидной активности ДС и их субстанций в виде сибиреязвенной живой вакцины СТИ-1 для людей (МТРУ-42 №10) (живая споровая культура сибиреязвенных вакцинных штаммов).

6. Bacillus anthracis, штамм 81/1 (pX01^{+}, pX02^{+}) или 27 (pX01^{+}, pX02^{+}).

Подвижные грамположительные палочки размером 3-5×1,0-1,2 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 15-20, оптимальная – 37±1; максимальная – 40. Споры размером 0,8×1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Анаэроб, на жидкой питательной среде растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, не вызывает помутнения; на плотной питательной среде образует R-формы, серовато-белые с ворсистым краем («львиная грива»), колонии размером 3-5 мм. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон; газ не образует; не разлагает арабинозу, рамнозу, маннозу, галактозу, рафенозу, лактозу, гекулин, маннит, дульцид, сорбит, инозит; не обладает гемолитической, фосфатазной, лицитинозной активностью; лизируется специфическим сибиреязвенным фагом; дает положительную реакцию с люминсцирующей адсорбированной сибиреязвенной сывороткой.

Используют при изучении спороцидной эффективности ДС при обеззараживании различных объектов с применением биологического метода контроля.

Приложение 2 (рекомендуемое)

Методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микроорганизмов, предназначенных для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций

1. Агар Хоттингера.

Мясной перевар по Хоттингеру (аминный азот от 140 до 160 мг%) – 1000 мл;

Натрий хлористый – 5,0 г;

Агар – 20,0 г;

pH 7,3±0,1.

Мясной перевар по Хоттингеру разводят дистиллированной водой до содержания аминного азота от 140 до 160 мг%, добавляют хлористый натрий и агар, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного расплавления агара. Фильтруют и стерилизуют при температуре 120°С в течение 30 мин.

2. Пшеничный агар.

Пшеничная крупа «Артек» (или «Полтавская» – 500,0 г;

Агар – 25,0 г;

Дистиллированная вода – 1000 мл;

pH 7,3±0,1.

Пшеничную крупу «Артек» (или «Полтавская») заливают дистиллированной водой. Через 18-24 ч настой аккуратно сливают, не выжимая, доводят до первоначального объема, добавляют агар и растапливают на водяной бане или в автоклаве (текучим паром 1 ч). Оставляют в теплом месте до осаждения осадка на 12 часов. Остывший агар выкладывают на противень и срезают осадок. Агар растапливают на водяной бане, постоянно помешивая. Устанавливают pH 7,3±0,1. Разливают в бутылки, пробирки, матрацы (в зависимости от решаемых

задач и целей). Стерилизуют текучим паром, в аппарате Коха, по 1 ч в течение 3 суток.

3. Картофельно-пептонный агар.

Пептон – 5,0 г;

Мел – 1,0 г;

Агар – 25,0 г;

Картофельная вода – 1000 мл;

pH 7,1 ±0,1.

Сырой картофель (из расчета 200 г очищенного картофеля на 1 л водопроводной воды) тщательно моют, очищают от кожуры и глазков, нарезают мелкими ломтиками, заливают водопроводной водой и кипятят 30 мин. после закипания (молодой картофель употреблять нельзя). Отвар отстаивают и фильтруют в холодном состоянии через ватно-марлевй фильтр. Доводят объем фильтрата до первоначального. Устанавливают pH 7,1±0,1. Добавляют пептон и агар. Нагревают, помешивая, до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, после чего добавляют мел. Разливают по флаконам, стерилизуют при 120°С в течение 30 мин. После стерилизации среду во флаконах скашивают.

4. Мясопептонный агар.

Методика приготовления изложена в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» (под ред. М. О. Биргера - М., Медицина, 1982).

5. Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой, НПО «Питательные среды», г. Махачкала (СПБ).

Питательный агар для культивирования микроорганизмов готовят согласно прописи на этикетке.

6. Бульон Хоттингера.

Мясной перевар по Хоттингеру (аминный азот 140 до 160) мг% – 1000 мл;

Натрий хлористый – 5,0 г;

Глюкоза – 5,0 г;

pH 7,3±0,1.

Мясной перевар по Хоттингеру разводят дистиллированной водой до содержания аминного азота от 140 до 160 мг%, добавляют хлористый натрий. Кипятят на слабом огне с закрытой крышкой 10 мин. до полного растворения соли. Если есть выкипание, доводят объем до первоначального дистиллированной водой. Устанавливают pH 7,3±0,1, кипятят повторно. Фильтруют, прибавляют глюкозу. Разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при 110°С в течение 30 мин.

7. Мясопептонный бульон.

Методика приготовления изложена в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» (под ред. М. О. Биргера – М., Медицина, 1982). Для приготовления бульона с глюкозой добавить 0,5 % глюкозы.

8. Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, НПО «Питательные среды», г. Махачкала (СПА).

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов готовят согласно прописи на этикетке. Для приготовления бульона добавить глюкозу (0,5%).

9. Цветная питательная среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым.

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой –готовят согласно прописи на этикетке;

Глюкоза – 5 г;

Бромкрезоловый пурпуровый спиртовый 1% – 2 мл;

Дистиллированная вода – до 1000 мл;

pH 7,3±0,1.

В питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, приготовленный согласно прописи на этикетке, добавляют 5 г глюкозы, перемешивают до полного растворения последней, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и добавляют 2 мл 1% спиртового раствора индикатора бромкрезолового пурпурового.

Устанавливают pH (7,3±0,1) и разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при температуре 110°С в течение 30 мин.

10. Цветная питательная среда с индикатором бромтимоловым синим.

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой – готовят согласно прописи на этикетке;

Глюкоза – 5 г;

Бромтимоловый синий спиртовой 1 % – 2 мл;

Дистиллированная вода – до 1000 мл;

pH 7,3±0,1.

В питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, приготовленный согласно прописи на этикетке, добавляют 5 г глюкозы, перемешивают до полного растворения последней, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и добавляют 2 мл 1% спиртового раствора индикатора индикатора бромтимолового синего. Устанавливают pH 7,3±0,1 и разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при температуре 110°С в течение 30 мин.

Приложение 3 (справочное)

Материалы и оборудование, необходимые для проведения исследований суспензии спор тест-микроорганизмов

1. При определении концентрации спор в суспензии:

термостат суховоздушный ТС-80М, ТУ 64-l-2622-75;

баня водяная;

пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 $см^3$ 2-го класса точности, ГОСТ 20292-74;

дозаторы пипеточные (фирмы «Bcoheat», Финляндия);

пробирки химические, ГОСТ 10515-63;

чашки Петри, ГОСТ 25336-82;

спиртовка лабораторная, ГОСТ 25336-82 или газовая горелка;

спирт этиловый, ректификационный технический, ГОСТ 18300-72;

электроплитка бытовая, ГОСТ 14919-83;

трубка медицинская резиновая, ГОСТ 3399-76;

зажимы пружинные для резиновых трубок, ТУ 64-1-964-79;

спринцовка резиновая, ТУ 38.106-141-80;

штативы лабораторные химические, ТУ 48-0534-8-87;

вата медицинская гигроскопическая, ГОСТ 5556-81;

карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904-78;-

секундомер механический, ГОСТ 8.423-81;

термометры, ГОСТ 215-73;

стерильная питьевая вода;

питательные среды, приведенные в приложении 2.

2. При определении устойчивости спор к текучему пару:

аппарат Ойль - Мюллера;

термостат суховоздушный ТС-80М, ТУ 64-1-2622-75;

пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 см3 2-го класса точности, ГОСТ 20292-74;

пробирки химические, ГОСТ 10515-63;

чашки Петри, ГОСТ 25336-82;

спиртовка лабораторная, ГОСТ 25336-82;

батист или отбельная бязь;

спирт этиловый, ректификационный технический, ГОСТ 18300-72;

электроплитка бытовая, ГОСТ 14919-83;

трубка медицинская резиновая, ГОСТ 3399-76;

зажимы пружинные для резиновых трубок, ТУ 64-1-964-79;

спринцовка резиновая, ТУ 38.106-141-80;

штативы лабораторные химические, ТУ 48-0534-8-87;

вата медицинская гигроскопическая, ГОСТ 5556-81;

карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904-78;

секундомер механический, ГОСТ 8.423-81;

термометры, ГОСТ 215-73;

дистиллированная вода, ГОСТ 6709-72;

мясо-пептонный бульон (МПБ), ВФС 42-366 ВС-92.

3. При определении устойчивости спор к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду:

баня лабораторная;

термостат суховоздушный ТС-80М, ТУ 64-1-2622-75;

пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 см3 2-го класса точности, ГОСТ 20292-74;

пробирки химические, ГОСТ 10515-63;

стаканы химические 50-100 мл, ГОСТ 10515-63;

чашки Петри, ГОСТ 25336-82;

спиртовка лабораторная, ГОСТ 25336-82;

батист или отбельная бязь;

спирт этиловый, ректификационный технический, ГОСТ 18300-72;

электроплитка бытовая, ГОСТ 14919-83;.

трубка медицинская резиновая, ГОСТ 3399-76;

зажимы пружинные для резиновых трубок, ТУ 64-1-964-79;

спринцовка резиновая, ТУ 38.106-141-80;

штативы лабораторные химические, ТУ 48-0534-8-87;

вата медицинская гигроскопическая, ГОСТ 5556-81;

карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904-78;

секундомер механический, ГОСТ 8.423-81;

термометры, ГОСТ 215-73;

дистиллированная вода, ГОСТ 6709-72;

мясо-пептонный бульон (МПБ), ВФС 42-366 ВС-92.

хлорамин или перекись водорода;

тиосульфат натрия.

1.8 Методы исследований и критерии оценки эффективности средств для предстерилизационной очистки медицинских изделий

1.8.1 Общие положения

Требования к средствам предстерилизационной очистки.

Химические средства, рекомендуемые для предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения, должны отвечать следующим требованиям:

обладать высокой моющей способностью, то есть за короткое время при температуре не выше плюс 50^0С обеспечивать удаление органических (белковых, в том числе кровяных, жировых и др.) и неорганических загрязнений, включая остатки лекарственных препаратов;

не оказывать фиксирующего действия на загрязнения при контакте с ними; средства для совмещения предстерилизационной очистки и дезинфекции изделий, не должны приводить к фиксирующему эффекту в рекомендуемых для такой обработки режимах;

хорошо растворяться в воде;

не приводить к обильному пенообразованию.

не приводить к повреждению обрабатываемых изделий;

иметь срок годности не менее 1 года;

средства, относящиеся к электрохимически активированным растворам (анолиты, католиты), вырабатываемым установками, должны иметь срок годности не менее 3 суток.

Правила изучения средств предстерилизационной очистки.

Средства, предназначенные для предстерилизационной очистки медицинских изделий, а также действующие вещества для производства

этих средств до начала исследований моющих свойств подлежат проверке на фиксирующее действие в следующих случаях:

если в состав средства входят спиртовые и/или альдегидные компоненты, и/или амины, надкислоты или их производные;

если на исследования представлено новое действующее вещество или в состав средства входит новый компонент(ы), относительно которого(ых) нет данных о фиксирующем действии.

Исследования порошкообразных средств, их рабочих растворов проводят только в случае их полного растворения в питьевой воде (если разработчиком специально не оговорена возможность присутствия остатков нерастворенных компонентов, которые не должны/не могут оказывать отрицательных воздействий на моющие свойства средства).

Для оценки эффективности действующих веществ (субстанций), предназначенных для производства средств предстерилизационной очистки, а также самих средств предстерилизационной очистки в лабораторных условиях в качестве тест-загрязнения применяют донорскую кровь.

1.8.2 Исследование эффективности действующих веществ (субстанций), предназначенных для производства средств предстерилизационной очистки медицинских изделий

Исследование фиксирующих свойств действующих веществ.

Для определения фиксирующего действия используют тест-изделия из следующих материалов:

металлов (скальпель хирургический остроконечный или брюшистый, стоматологический диск алмазный);

резин из натурального и синтетического каучука (фрагменты дренажных трубок длиной 10 мм);

стекла (предметное стекло или крышка чашки Петри).

В день постановки эксперимента на поверхность каждого тест-изделия (обязательно на поверхность канала фрагмента дренажной трубки) с помощью глазной или стеклянной (объем 1-2 мл) пипетки наносят по две капли (диаметр не менее 3 мм) консервированной донорской крови и подсушивают до полного высыхания в течение 45-90 мин. (в зависимости от влажности воздуха в помещении).

Готовят рабочие растворы действующего вещества с различными, подлежащими изучению концентрациями.

Эксперименты проводят при температуре воздуха в помещении и температуре растворов средства 20±2°С.

Тест-изделия, загрязненные кровью, после подсушивания погружают (избегая соприкосновения с краями емкости) в приготовленный рабочий раствор на различное время (максимальное время воздействия раствора не должно превышать 20 мин.).

По истечении времени выдержки каждое тест-изделие ополаскивают под струей проточной (120 л/час[3]) питьевой воды в течение 30 сек., не допуская прямого попадания струи воды на места, первоначально загрязненные кровью.

Для оценки фиксирующих свойств используют рабочие растворы тех концентраций и при том времени воздействия, которые оказались эффективными при оценке антимикробных свойств. Все манипуляции проводят аналогично, указанному выше.

---

[3] Объем воды измеряют с помощью мерного сосуда и секундомера. С помощью водопроводного крана регулируют поток воды таким образом, чтобы за 30 секунд в мерный сосуд поступал 1 л воды.

О наличии фиксирующих свойств у действующих веществ судят, визуально оценивая наличие остатков крови на поверхности тест-изделия в местах нанесения крови после его выдержки в рабочем растворе средства и ополаскивания под проточной питьевой водой.

Критерии фиксирующего действия.

Группа А – отсутствие визуально наблюдаемого ореола на поверхности тест-изделия в местах первоначального нанесения капель крови свидетельствует о том, что раствор не оказывает фиксирующего действия (условное обозначение «–»).

Группа В – наличие визуально наблюдаемого ореола на поверхности тест-изделия в местах первоначального нанесения капель крови свидетельствует о том, что раствор оказывает слабое фиксирующее действие (условное обозначение «+»).

Группа Г – наличие визуально наблюдаемых следов крови на поверхности тест-изделия в местах первоначального нанесения капель крови свидетельствует о том, что раствор оказывает умеренное фиксирующее действие (условное обозначение «++»).

Группа Д – наличие визуально наблюдаемых явно выраженных остатков крови на поверхности тест-изделия в местах первоначального нанесения капель крови свидетельствует о том, что раствор оказывает сильное фиксирующее действие (условное обозначение «+++»).

Исходя из критериев по фиксирующему действию дезинфицирующие средства целесообразно использовать для предстерилизационной очистки, в том числе совмещенной с дезинфекцией, медицинских изделий (с подсушенными загрязнениями), если они относятся к группе А.

Если дезинфицирующие средства относятся к группе В, то их можно использовать для предстерилизационной очистки, в том числе совмещенной с дезинфекцией, медицинских изделий (не допуская подсушивания загрязнений).

Если дезинфицирующие средства относятся к группе Г, то их можно использовать для предстерилизационной очистки, в том числе совмещенной с дезинфекцией, медицинских изделий (не допуская подсушивания загрязнений) с предварительным удалением видимых загрязнений с поверхностей и из каналов изделий.

Дезинфицирующие средства, относящиеся к группе Д не целесообразно использовать для предстерилизационной очистки, в том числе совмещенной с дезинфекцией, медицинских изделий.

Определение эффективности действующих веществ.

Для определения эффективности (моющих свойств) действующих веществ используют тест-изделия (в количестве не менее 10, относящихся к конкретной группе[4]) из различных материалов: металлов (хирургические инструменты – пинцеты, скальпели, ножницы, зажимы; стоматологические инструменты – боры твердосплавные и алмазные, зеркала цельнометаллические и с амальгамой, щипцы, гладилки), стекла, пластмасс, резин на основе натурального и силиконового каучука (фрагменты трубок длиной 10 мм и внутренним диаметром 2-7 мм). При необходимости определения эффективности средств для предстерилизационной очистки медицинских изделий иной конструкции (эндоскопы, инструменты к ним и др.) используют

[4] конкретные группы однородных изделий: – изделия, имеющие замковые части; – изделия, имеющие каналы; – изделия, не имеющие замковых частей или каналов (кроме стоматологических инструментов, имеющих алмазные рабочие части); – вращающиеся стоматологические инструменты, имеющие алмазные рабочие части.

изделия, относящие к конкретной группе (эндоскопы и инструменты к ним в количестве не менее 3).

Новые тест-изделия предварительно очищают от масел, механических загрязнений, моют и стерилизуют паровым методом. Тест-изделия из металлов и стекла могут быть простерилизованы воздушным методом.

В качестве тест-загрязнения применяют донорскую кровь. Эксперименты проводят при температуре воздуха в помещении 20±2°С.

В день постановки эксперимента тест-изделия загрязняют донорской кровью с помощью глазной или стеклянной (объем 1-2 мл) пипетки:

− на поверхность рабочей части тест-изделия из металлов наносят одну каплю и в замковую часть две капли крови (диаметр каждой капли не менее 3 мм), и делают несколько рабочих движений для проникновения крови в труднодоступные участки замковой части инструмента;

− во внутреннюю часть тест-изделий из резин, пластмасс и стекла наносят две капли крови, которые должны быть распределены по всей внутренней поверхности тест-изделия.

Загрязненные тест-изделия подсушивают до полного высыхания в течение 45-90 мин. (в зависимости от температуры и влажности воздуха в помещении).

Готовят рабочие растворы действующего вещества с различными, подлежащими изучению концентрациями. Температура рабочего раствора должна быть в пределах 18-22°С.

Тест-изделия, загрязненные кровью, погружают в приготовленный рабочий раствор на различное время (максимальное время воздействия раствора не должно превышать 20 мин.), каждый раз по окончании

которого осуществляют механическую очистку с помощью различных приспособлений (щетки, ерши, марлевые салфетки, ватные тампоны, шприцы – в зависимости от конструкционных особенностей изделий) в той же порции раствора, в которой проводили замачивание, а затем ополаскивают под проточной питьевой водой в течение 1 мин.

При работе с действующими веществами, предназначенными одновременно для производства средств дезинфекции медицинских изделий, для оценки моющих свойств используют рабочие растворы тех концентраций и при том времени воздействия, которые оказались эффективными при оценке антимикробных свойств. Все манипуляции проводят аналогично указанному выше, за исключением этапа промывания под проточной питьевой водой.

При определении эффективности действующих веществ, предназначенных для производства средств предстерилизационной очистки, помимо изучения зависимости моющего действия от концентрации действующего вещества и времени воздействия раствора, при необходимости исследуют зависимость эффективности от температуры и pH раствора.

Оценку моющих свойств действующего вещества проводят визуально, оценивая наличие или отсутствие остатков крови на поверхности тест-изделия в местах нанесения крови после его выдержки в рабочем растворе и ополаскивания под проточной питьевой водой, исходя из критериев фиксирующего действия.

Если действующее вещество (субстанция) относится к группе А-Г, то его можно использовать в производстве средств предстерилизационной очистки.

Если действующее вещество (субстанция) относится к группе Д, то это свидетельствует о том, что действующее вещество не обладает

достаточными моющими свойствами для использования в производстве средств предстерилизационной очистки.

1.8.3 Исследование эффективности средств для предстерилизационной очистки медицинских изделий

1.8.3.1 Определение эффективности средств в лабораторных условиях

Исследование фиксирующих свойств средств для предстерилизационной очистки медицинских изделий проводят аналогично исследованию фиксирующих свойств действующих веществ (п. 1.9.2.). При необходимости испытывают растворы с начальной повышенной (но не выше плюс 50°С) температурой; конкретную температуру подбирают применительно к конкретному средству.

Определение эффективности средств для предстерилизационной очистки ручным способом.

Для определения эффективности (моющих свойств) средств для предстерилизационной очистки используют тест-изделия аналогичные указанным в п. 1.9.2.

В качестве тест-загрязнения применяют донорскую кровь. Эксперименты проводят при температуре воздуха в помещении 20±2°С.

В день постановки эксперимента тест-изделия загрязняют донорской кровью аналогично, указанному в п. 1.9.2.

Готовые к применению средства (не требующие разбавления), используют в экспериментах в исходном виде. Из средств в виде порошка или жидкого концентрата готовят рабочие растворы с различными, подлежащими изучению концентрациями действующего вещества (действующих веществ). Температура готового средства или рабочего раствора средства должна быть в пределах 18-22°С. При необходимости испытывают растворы с начальной повышенной (но не

выше плюс 50°С) температурой; конкретную температуру подбирают применительно к конкретному средству.

Тест-изделия, загрязненные кровью, промывают под проточной питьевой водой в течение 30 сек. и погружают (избегая соприкосновения с краями емкости) в приготовленный рабочий раствор (растворы) на различное время (максимальное время воздействия раствора не должно превышать 30 мин.), каждый раз по окончании которого осуществляют механическую очистку с помощью различных приспособлений (щетки, ерши, марлевые салфетки, ватные тампоны, шприцы – в зависимости от конструкционных особенностей тест-изделий) в той же порции раствора, в которой проводили замачивание.

При работе со средствами, предназначенными одновременно для дезинфекции медицинских изделий, для оценки моющих свойств используют рабочие растворы тех концентраций и при том времени воздействия, которые оказались эффективными при оценке антимикробных свойств. Все манипуляции проводят аналогично, указанному в п. 1.9.2., за исключением этапа промывания под проточной питьевой водой.

При определении эффективности средств, предназначенных для предстерилизационной очистки, помимо изучения зависимости моющего действия от концентрации действующего вещества и времени воздействия раствора, при необходимости исследуют зависимость эффективности от температуры.

Оценку моющих свойств средства проводят путем постановки азопирамовой пробы, оценивая наличие или отсутствие крови на тест-изделиях (после их выдержки и механической очистки в рабочем растворе и ополаскивания под проточной питьевой водой).

Методика постановки азопирамовой пробы. Определение скрытой крови с помощью комплекта реактива №1 (амидопирин в порошке, медицинский) и реактива №2 (солянокислый анилин, чда) «Азопирам».

Приготовление спиртового раствора реактива «Азопирам».

10 г реактива №1 и 0,15 г реактива №2 смешивают в сухой мерной колбе (150 мл), добавляют 50 мл 95% этилового спирта (ГОСТ 18300-87), тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем 95% этиловым спиртом до 100 мл.

Примечание: Спиртовой раствор «Азопирам» следует хранить в закрытой стеклянной колбе с притертой пробкой в холодильнике при температуре 4-8°С не более 2 месяцев или в темном месте при комнатной температуре (не выше плюс 25°С) не более 1 месяца. Небольшое пожелтение спиртового раствора «Азопирам» в процессе хранения не снижает его рабочих качеств.

Приготовление рабочего раствора реактива «Азопирам».

Непосредственно перед проверкой качества предстерилизационной очистки изделий готовят рабочий раствор, смешивая равные объемные количества раствора реактива «Азопирам» и 3% раствора перекиси водорода.

Пригодность рабочего раствора реактива «Азопирам» проверяется в случае необходимости: 2-3 капли этого раствора наносят на кровяное пятно. Если не позже, чем через 1 мин., появляется фиолетовое окрашивание, переходящее затем в сиреневый цвет, реактив пригоден к употреблению, если окрашивание в течение 1 мин. не появляется, реактивом пользоваться нельзя.

Исследование качества предстерилизационной очистки изделий.

Рабочим раствором реактива «Азопирам» обрабатывают исследуемые изделия: протирают тампонами, смоченными рабочим раствором или наносят несколько капель рабочего раствора на рабочие части исследуемых изделий с помощью пипетки.

Внимание! У изделий, имеющих замковые части, обрабатывают помимо рабочих частей и замковые части.

В шприцы наливают 3-4 капли рабочего раствора реактива и несколько раз продвигают поршнем для того, чтобы смочить рабочим раствором внутреннюю поверхность шприца, особенно места соединения стекла с металлом, где чаще всего остается кровь, рабочий раствор в шприце оставляют на 0,5-1,0 мин., после чего его вытесняют на марлевую салфетку.

При проверке качества очистки игл рабочий раствор набирают в чистый, не имеющий следов коррозии шприц, и, последовательно меняя иглы, пропускают рабочий раствор через них, выдавливая 3-4 капли на марлевую салфетку.

Качество очистки катетеров или других полых изделий оценивают путем введения рабочего раствора внутрь изделий с помощью чистого шприца или пипетки. Рабочий раствор оставляют внутри изделия в течение 0,5-1,0 мин., после чего его сливают на марлевую салфетку. Количество рабочего раствора, вносимого внутрь изделия, зависит от величины изделия.

Контролю подвергают 1% от одновременно обработанных изделий одного наименования, но не менее 3-5 единиц.

Индикация загрязнений.

В присутствии следов крови немедленно или не позднее, чем через 1 мин. после контакта реактива с загрязненным участком, появляется

окрашивание, вначале фиолетовое, затем быстро, в течение нескольких секунд переходящее в розово-сиреневое или буроватое.

Окрашивание, наступившее позже, чем через 1 мин. после обработки исследуемых изделий, не учитывается.

Рабочий раствор реактива «Азопирам» выявляет наличие гемоглобина, пероксидаз растительного происхождения (растительных остатков), окислителей (хлорамина, хлорной извести, стирального порошка с отбеливателем, хромовой смеси для обработки посуды и др.), а также ржавчины (окислов и солей железа) и кислот.

Буроватое окрашивание наблюдается при наличии на исследуемых предметах ржавчины и хлорсодержащих окислителей. В остальных случаях окрашивание розово-сиреневое.

Особенности реакции.

Исследуемые изделия должны иметь комнатную температуру (желательно не выше 25°С). Нельзя подвергать проверке горячие изделия, а также держать рабочий раствор на ярком свету или при повышенной температуре (вблизи нагревательных приборов и т. п.).

Рабочий раствор реактива «Азопирам» должен быть использован в течение 1-2 часов. При более длительном стоянии может появиться спонтанное розовое окрашивание. При температуре выше 25°С рабочий раствор реактива розовеет быстрее, поэтому его рекомендуют использовать в течение 30-40 мин.

После проверки, независимо от ее результатов, следует удалить остатки рабочего раствора реактива «Азопирам» с исследованных изделий, обмыв их водой или протерев тампоном, смоченным водой или спиртом.

При получении «положительной азопирамовой пробы» (наличие скрытой крови на изделиях) следует повторить предстерилизационную очистку этих изделий.

Меры предосторожности.

Реактив №1 и реактив №2 и его растворы должны храниться в плотно закрывающихся емкостях отдельно от пищевых продуктов, лекарственных препаратов, дезинфицирующих средств, крепких кислот и щелочей.

Приготовление спиртового и рабочего растворов реактива «Азопирам» проводится на лабораторном столе в хорошо вентилируемом помещении, желательно в вытяжном шкафу, следует избегать пыления реактивов. При приготовлении 3% перекиси водорода из пергидроля следует пользоваться резиновыми перчатками.

При попадании на кожу реактивов №1 и №2, спиртового и рабочего растворов реактива «Азопирам», 3% раствора перекиси водорода или пергидроля, их следует удалить чистой ватой или марлей (ветошью) и место контакта обмыть водой. При попадании реактивов на слизистые место контакта следует обильно промыть большим количеством холодной воды.

Рассыпанные или пролитые реактивы удаляют, а место, где они находились, промывают или протирают тампонами, смоченными водой или спиртом.

Спиртовый и рабочий растворы реактива «Азопирам» относятся к горючим растворам, так как в их состав входит спирт. Поэтому нельзя допускать контакта с открытым огнем и раскаленными поверхностями нагревательных приборов.

При приготовлении и использовании реактива «Азопирам» следует руководствоваться правилами техники безопасности,

изложенными в руководствах по охране труда работников здравоохранения.

Определение эффективности средств для предстерилизационной чистки механизированным способом.

Экспериментальные исследования по оценке эффективности средств для предстерилизационной очистки механизированным способом проводят в ультразвуковых установках, зарегистрированных в Российской Федерации и разрешенных к применению в медицинских организациях для очистки медицинских изделий из металлов.

Для определения эффективности (моющих свойств) средств для предстерилизационной очистки используют тест-изделия, имеющие замковые части, из металлов (ножницы хирургические, зажимы кровоостанавливающие, корнцанги, стоматологические щипцы).

В качестве тест-загрязнения применяют донорскую кровь. Эксперименты проводят при температуре воздуха в помещении 20±2С.

В день постановки эксперимента тест-изделия загрязняют донорской кровью с помощью глазной или стеклянной (объем 1-2 мл) пипетки: на поверхность рабочей части тест-изделия наносят одну каплю и в замковую часть две капли крови (диаметр каждой капли не менее 3 мм), и делают несколько рабочих движений для проникновения крови в труднодоступные участок замковой части инструмента.

Загрязненные тест-изделия подсушивают до полного высыхания в течение 45-90 мин. (в зависимости от температуры и влажности воздуха в помещении).

Тест-изделия, загрязненные кровью, ополаскивают под проточной питьевой водой в течение 30 сек. (при изучении средства, предназначенного для совмещения процесса очистки и дезинфекции ополаскивание тест-изделий не проводят) и размещают их в

загрузочной корзине ультразвуковой установки раскладывая их раскрытыми, обеспечивая свободный доступ рабочего раствора средства. Тест-изделия размещают не более чем в 3 слоя, при этом каждый последующий слой располагают со сдвигом по отношению к тест-изделиям предыдущего слоя.

Загрузочную корзину с тест-изделиями погружают в рабочую ванну ультразвуковой установки с приготовленным рабочим раствором изучаемого средства и подвергают ультразвуковому воздействию различное время (максимальное время ультразвукового воздействия не должно превышать 15 мин.; для стоматологических щипцов – 20 мин.).

По окончании ультразвуковой обработки извлекают загрузочную корзину, вынимают тест-изделия и помещают их в пластмассовую емкость для ополаскивания проточной питьевой водой (1 мин.).

Качество очистки изделий от кровяных загрязнений после обработки раствором средства механизированным способом оценивают с помощью азопирамовой пробы в соответствии с методикой, изложенной в п. 5.9.3.1.

1.8.3.2. Определение эффективности средств в практических условиях

Определение эффективности средств для предстерилизационной очистки ручным способом.

Определения эффективности средства в практических условиях проводит персонал, осуществляющий в медицинских организациях подготовку медицинских изделий к стерилизации.

Медицинские испытания проводят не менее чем в течение 1 месяца при ежедневном использовании средства для обработки изделий.

Для определения эффективности (моющих свойств) средств для предстерилизационной очистки ручным способом используют изделия, которые должны быть подвергнуты стерилизации перед их использованием у пациентов, из различных материалов (металлы, резины на основе натурального и синтетического каучука, пластмасса, стекла).

Готовые к применению средства (не требующие разбавления), используют в экспериментах в исходном виде. Из средств в виде порошка или жидкого концентрата готовят рабочие растворы с различными, подлежащими изучению концентрациями действующего вещества (действующих веществ). Эксперименты проводят при температуре рабочих растворов, указанной в программе.

Изделия, подлежащие очистке, промывают под проточной питьевой водой в течение 30 сек. и погружают (замачивают) на различное время (указано в программе испытаний) в средство (рабочий раствор) каждый раз по окончании которого осуществляют механическую очистку с помощью различных приспособлений (щетки, ерши, марлевые салфетки, ватные тампоны, шприцы – в зависимости от конструкционных особенностей тест-изделий) в той же порции средства (рабочего раствора), в которой проводили замачивание. После окончания механической очистки изделия ополаскивают проточной питьевой водой (время указано в программе) и дистиллированной водой.

При работе со средствами, предназначенными одновременно для дезинфекции медицинских изделий, для оценки моющих свойств используют рабочие растворы тех концентраций и, при том, времени воздействия, которые оказались эффективными при оценке антимикробных свойств. Все манипуляции проводят аналогично,

указанному в п. 1.9.2. за исключением этапа промывания под проточной питьевой водой.

Оценку эффективности (моющих свойств) средства проводят путем постановки азопирамовой пробы оценивая наличие или отсутствие крови на изделиях, подвергнутых очистке, в соответствии с методикой, изложенной в п. 1.8.3.1.

Результаты медицинских испытаний оформляют в форме протокола.

Определение эффективности средств для предстерилизационной очистки механизированным способом.

Эффективность средства в практических условиях оценивают в соответствии с Программой и методикой проведения медицинских испытаний конкретного моющего или моюще-дезинфицирующего средства в лечебно-профилактических учреждениях по режимам, указанным в данной программе.

Целью медицинских испытаний является оценка режимов, разработанных при проведении исследований эффективности средства для цели предстерилизационной очистки, в том числе совмещенной с процессом дезинфекции, медицинских изделий.

Определения эффективности средства в практических условиях проводит персонал, осуществляющий в медицинских организациях подготовку медицинских изделий к стерилизации.

Медицинские испытания проводят не менее чем в течение 1 месяца при ежедневном использовании средства для обработки изделий.

Экспериментальные исследования по оценке эффективности средств для предстерилизационной очистки механизированным способом проводят в ультразвуковых установках, зарегистрированных в

Российской Федерации и разрешенных к применению в лечебно-профилактических учреждениях для очистки медицинских изделий из металлов.

Для определения эффективности (моющих свойств) средств для предстерилизационной очистки механизированным способом используют изделия, которые должны быть подвергнуты стерилизации перед их использованием у пациентов, из металлов.

Готовые к применению средства (не требующие разбавления), используют в экспериментах в исходном виде. Из средств в виде порошка или жидкого концентрата готовят рабочие растворы с различными, подлежащими изучению концентрациями действующего вещества (действующих веществ). Эксперименты проводят при температуре рабочих растворов, указанной в программе.

Изделия, подлежащие очистке, промывают под проточной питьевой водой в течение 30 сек. (при испытании средства, предназначенного для совмещения процесса очистки и дезинфекции ополаскивание изделий не проводят) и размещают их в загрузочной корзине ультразвуковой установки раскладывая их раскрытыми, обеспечивая свободный доступ рабочего раствора средства. Изделия размещают не более чем в 2-3 слоя (определяется Программой испытаний), при этом каждый последующий слой располагают со сдвигом по отношению к изделиям предыдущего слоя.

Загрузочную корзину с изделиями погружают в рабочую ванну ультразвуковой установки с приготовленным рабочим раствором изучаемого средства и подвергают ультразвуковому воздействию различное время (указано в Программе испытаний).

По окончании ультразвуковой обработки извлекают загрузочную корзину, вынимают изделия и помещают их в пластмассовую емкость

для ополаскивания проточной питьевой водой (определяется Программой испытаний).

Оценку эффективности (моющих свойств) средства проводят путем постановки азопирамовой пробы оценивая наличие или отсутствие крови на изделиях, подвергнутых очистке механизированным способом, в соответствии с методикой, изложенной в п. 1.8.3.1.

Результаты медицинских испытаний оформляют в форме протокола.

1.9. Методы изучения и оценки антимикробной активности дезинфицирующих средств

1.9.1. Требования к проверяемому раствору дезинфицирующего средства

Проверяемые растворы дезинфицирующего средства составляются в виде разведения концентрата в соответствии с методом непосредственно перед проверкой водой стандартизованной жесткости. Каждый концентрат перед использованием и перед приготовлением испытательных концентраций необходимо встряхивать.

Для жидких дезинфицирующих средств концентрация его указывается в миллилитрах (мл) в 100 мл полного объема (объемный процент), для сухих веществ или паст – в количестве граммов (г) в 100 мг полного объема. Если в виде сухих веществ или паст в измерительную колбу отвешивается не менее 1,0 г±10 мг и доливается водой. Процентные данные относятся к концентрированному продукту, но не к содержанию его эффективного вещества.

Особые указания изготовителя по получению точной концентрации должны быть подробно описаны.

При установлении пределов эффективности с целью сравнимости результатов необходимо соблюдать следующие концентрации (%). Другие концентрации могут оказаться необходимыми для установления эффективности определенных средств.

100%	7,5%	1%	0,0125%
75%	5%	0,75%	0,00625%
50%	4%	0,5%	0,003125%
25%	3%	0,25%	0,0015625%
20%	2,5%	0,1%	(и т.д. в геометрической прогрессии)
15%	2,0%	0,05%	
10%	1,5%	0,025%	

Примечание: 100% относится к концентрированному продукту. Все другие концентрации относятся к концентрациям в тесте, что означает, что перед разведением в зависимости от условий теста должен быть учтен коэффициент.

Данное перечисление не означает, что испытываться должны принципиально последовательные концентрации. Напротив, в зависимости от продукта, проверяемые концентрации необходимо выбирать таким образом, чтобы пределы эффективности могли быть зарегистрированы поддающимися учету КОЕ. Для этого в тестах «in vivo» также требуются различные продолжительности воздействия. В зависимости от рецептуры проверяемого продукта (например, йодофор, высокие концентрации спирта) может оказаться необходимым также проверять и концентрат. В определенных методах в качестве минимального требования выдвигается определенное снижение КОЕ в результате действия выбранной концентрации продукта, поэтому эти концентрации должны быть включены в тест.

1.9.2. Реактивы, питательные среды, тест-культуры:

– отягощающие нагрузки (Приложение А.1.8.);

– казеин-соево- пептонный агар;

– казеин-соево-пептонный раствор;

– мясо-пептонный агар;

– агар из солодового экстракта;

– бульон солодового экстракта;

– среда Сабуро;

– глюкозная среда Сабуро;

– глюкозный бульон Сабуро;

– МПБ;

– СКС;

– нейтрализующие средства (ПриложениеА.1.7.);

– этанол 70 %;

– пропанол-1 60%;

– пропанол-2 70%;

– промывочные жидкости (Приложение А.1.5.);

– дважды дистиллированная вода;

– вода стандартной жесткости;

– хлорид натрия;

– калиевое мыло (Приложение А.1.6.);

– тест-носители (ПриложениеА.2.);

– тест-культуры:

– Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799);

– Enterococcus faecitum ATCC 6057 (ДСМ 2146);

– Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320);

– Escherichia coli К12 НСТС10538;

– Escherichia coli ATCC 11229;

– Proteus mirabilis ATCC 14153 (ДСМ 788);

– Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939);

– Mycobacterium terrae ATCC 15755 (ДСМ43227);

– Mycobacterium smegmatis cip 7326;

– Mycobacterium avium ATCC 15769 (ДСМ 44157);

– Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386);

– Aspergilla niger ATCC16404 (ДСМ 1988);

– Trichofiton mentagrophytes A TCC 3533 (ДСМ 4870).

Из микроорганизмов, используемых для проверки дезинфицирующих средств и антисептиков, получают основные культуры, из которых изготавливаются соответствующие рабочие культуры, а из них - используемые для проверки суспензии.

Описание приготовления питательных сред см. в Приложении А.1.4.

1.9.3. Подготовка к выполнению испытаний

1.9.3.1. Приготовление основных культур

Приготовление культуры бактерий (кроме микобактерий).

Из лиофилизированного образца бактериального штамма готовится суспензия в соответствии с рекомендациями в сопроводительной документации к этому образцу.

Непосредственно из суспензии производится посев на казеин-соево-пептонный агар (КСА) или мясо-пептонный агар (МПА) с целью получения отдельных колоний. Засеянные культуры инкубируют в течение 18-24 ч при 36±1°С.

После инкубации выросшую культуру используют для проверки чистоты штамма и для получения основной культуры для опыта. Поверхность чашки Петри с КСА или МПА равномерно засевают используемой культурой. Посевы инкубируют 18-24 часа при 36±1°С.

На поверхность КСА (МПА)-культуры наносят 10 мл защитного, раствора для замораживания (см. Приложение А.1.4.) и клетки

размешивают. Клеточную суспензию отсасывают с поверхности агара, разводят защитным раствором до 100 мл и инкубируют в течение 30 мин. при 20°С.

По 1 мл суспензии с помощью пипетки переносят в низкотемпературные пробирки со стеклянными или керамическими бусами. Пробирки встряхивают, чтобы распределить клеточную суспензию на бусинах. Избыточное количество защитного раствора отсасывают с помощью пипетки. Низкотемпературные пробирки хранят при температуре не выше 70°С не более 12 месяцев.

Для обеспечения качества основной культуры рекомендуется проводить проверку чистоты после замораживания в течение недели, а также через регулярные промежутки времени.

Приготовление культуры Candida albicans

Порядок приготовления основной культуры соответствует порядку приготовления культуры бактерий. В качестве питательной среды используют агар из солодового экстракта (СЭА), бульон солодового экстракта (СЭБ) или среду Сабуро. Культуры инкубируют при 30±1°С в течение 42-48 часов.

Приготовление культуры плесневых грибов

Лиофилизированный образец культуры переводят в суспензию в соответствии с прилагаемыми к нему рекомендациями. Две пробы суспензии высевают в чашки Петри на СЭА или на среду Сабуро. Культуры инкубируют в течение 7-9 дней при 30±1°С.

После инкубации одну из культур используют для подтверждения чистоты штамма. Параллельно закладывают рабочие культуры.

На поверхность выросшей культуры на агаре СЭА (среде Сабуро) наносят 10 мл бидистиллированной воды. Конидии отделяют стеклянным шпателем и переводят в раствор. Суспензию переносят в

колбу Эрленмайера и осторожно встряхивают в течение 1 мин. со стеклянными или керамическими бусинами (примерно 10 бусин размером 3-4 мм на каждые 10 мл суспензии). Суспензию фильтруют через стекловолоконную вату и переносят в стеклянную пробирку для центрифугирования. Отфильтрованную суспензию центрифугируют 20 мин. при 2000 об./мин., после чего готовят суспензию конидий в 100 мл защитного раствора для замораживания (см. Приложение А.1.4.).

По 1 мл суспензии переносят пипеткой в низкотемпературные склянки со стеклянными или керамическими бусинами. Пробирку встряхивают для распределения клеточной суспензии по бусинам. Приготовленный состав оставляют на 30 мин. при 20°С. Избыток защитного раствора отсасывают с помощью пипетки. Низкотемпературные пробирки помещают в морозильное устройство при температуре минус 70°С и хранят не более 12 месяцев.

Для обеспечения качества исходных культур рекомендуется проверка чистоты после замораживания в течение недели, а затем через регулярные промежутки времени.

Приготовление культуры Trichofiton mentagrophytes

Порядок действий при приготовлении исходной культуры соответствует порядку действий для приготовления бактериальных культур, только вместо КСА и КСР в качестве питательной среды используют среду Сабуро или бульон Сабуро. Культуры инкубируют при 22+1°С в течение 14 дней.

Приготовление культуры микобактерий

Лиофилизированный образец микобактерий суспендируют в 100 мл защитного раствора (см. Приложение А.1.4.) в соответствии с рекомендациями, прилагаемыми к нему. Смесь оставляют на 30 мин.

при 20°С. Из суспензии производят посев на Middlebrok агар. После инкубации в течение 21 дня при 36±1°С выросшую культуру используют для проверки чистоты штамма. Для предохранения от высыхания, чашку необходимо заклеить или упаковать в полиэтиленовый пакет. Параллельно закладывают рабочие культуры.

В низкотемпературные пробирки пипеткой переносят по 1 мл суспензии. Пробирки встряхивают, чтобы равномерно распределить клеточную суспензию по стеклянным или керамическим бусинам. Затем смесь оставляют на 30 мин. при 20°С. Избыток защитного раствора удаляют с помощью пипетки. Низкотемпературные пробирки помешают в морозильное устройство при температуре не выше минус 70°С и сохраняют там не более 12 месяцев.

Для обеспечения качества исходных культур рекомендуется проверка чистоты после замораживания в течение недели, а затем через регулярные промежутки времени.

Приготовление культуры Bacillus subtilis, Bacillus cereus

Лиофилизированный образец Bacillus subtilis, Bacillus cereus переводят в суспензию в соответствии с рекомендациями. Две пробы суспензии высевают в чашки Петри на среду МПА или КСА. Культуры инкубируют при 30±1°С в течении 8-10 дней. После инкубации одну из культур используют для подтверждения чистоты штамма. Параллельно закладывают рабочие культуры. Суспензию переносят в пробирки, центрифугируют при 2000 об./мин., не менее 4 раз промывают. Взвеси спор в пробирках суспендируют в 100 мл защитного раствора (см. Приложение А.1.4.).

В низко температурные пробирки пипеткой переносят по 1 мл суспензии. Пробирки встряхивают, чтобы равномерно распределить суспензию спор по стеклянным или керамическим бусинам. Затем смесь

оставляют на 30 мин. при 20°С. Избыток защитного раствора удаляют с помощью пипетки. Низкотемпературные пробирки помешают в морозильную камеру при температуре не выше минус 70°С и сохраняют не более 12 месяцев.

1.9.3.2. Приготовление рабочих культур

Приготовление культуры бактерий (кроме микобактерий)

Для того чтобы приготовить рабочую культуру бактерий, с помощью пинцета из исходной культуры берут отдельные бусины и суспендируют в КСР (МПБ). Из этой суспензии посредством посевов на КСА (МПА) закладывают две субкультуры: одна из них служит для обогащения, а другая для подтверждения чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют при 36±1°С. После инкубации в течение 18-24 часов от предназначенной для обогащения культуры закладывают вторую субкультуру. Если это невозможно выполнить в один и тот же день, то для дальнейшего повторного высевания допускается применять 48-часовую субкультуру при условии, что эта субкультура в течение 48 часов находилась в термостате. В этих условиях следует приготовить следующую 24-часовую субкультуру прежде чем продолжать выполнение метода. Вторая и/или третья субкультура является рабочей культурой. Приготовление четвертой субкультуры не допускается.

Приготовление культуры Candida albicans

Для приготовления рабочей культуры из пробирок с исходной культурой пинцетом извлекают отдельные бусины и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой суспензии с помощью посевов на СЭА (среда Сабуро) закладывают две субкультуры: одна служит для обогащения, вторая предназначена для получения отдельных колоний с

дальнейшим определением чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют при 30±1°С.

После инкубации в течение 42-48 часов от культуры, предназначенной для обогащения закладывается вторая субкультура. Если в этот день это невозможно, то для дальнейшего высевания допускается использовать 72-часовую субкультуру. При этих условиях необходимо приготовить следующую 48-часовую субкультуру, прежде чем продолжить выполнение метода.

Вторая и третья субкультура является рабочей культурой. Приготовление четвертой субкультуры не допускается.

Приготовление культуры плесневых грибов

Для приготовления рабочей культуры плесневых грибов из пробирок с исходной культурой пинцетом извлекают отдельные бусины и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой суспензии посредством посевов на СЭА закладывают две субкультуры. Одна из них служит для обогащения, а вторая для получения отдельных колоний для подтверждения чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют в течение 7-9 дней при 30±1 °С.

Используя культуру, предназначенную для обогащения, клетки суспендируют в 10 мл бидистиллированной воде. Конидии отделяют с поверхности культуры стеклянным шпателем. Суспензию переносят в колбу Эрленмейера и слегка встряхивают со стеклянными бусинами в течение 1 минуты. Суспензию фильтруют через фильтр из спекшихся частиц стекла.

Приготовление культуры Trichophyton mentagrophytes

Для приготовления суспензии Trichophyton mentagrophytes используют культуры на среде Сабуро. После инкубирования культур в течение 2 недель при 22±1°С, каждую покрывают слоем 10 мл КСР.

Затем колонии осторожно снимают петлей и переносят в следующие 10 мл КСР. Для удаления более крупных частичек, суспензию необходимо профильтровать через стекловолоконную вату.

Приготовление культуры микобактерий

Для приготовления рабочей культуры микобактерий, отдельные бусины пинцетом извлекают из пробирок с исходной культурой и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой суспензии с помощью посевов на Middlebrok агар закладывают две субкультуры. Одна из них служит для обогащения, а вторую используют для подтверждения чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют при 36±1°С. Для защиты от высыхания чашки необходимо заклеить или поместить в полиэтиленовые пакеты. Через 21 день от культуры, предназначенной для обогащения, закладывают вторую субкультуру. Первая и/или вторая субкультура является рабочей культурой. Приготовление третьей субкультуры не допускается.

Приготовление культуры Bacillus subtilis, Bacillus cereus

Для приготовления рабочей культуры отдельные бусины пинцетом извлекают из пробирок с исходной жидкостью и суспендируют в бидистилированной воде. Из этой суспензии с помощью посевов на МПА закладывают две субкультуры. Одна из них служит для обогащения, а вторая для получения отдельных колоний для подтверждения чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют 7-9 дней при 30±1°С.

Используя культуру предназначенную для обогащения, споры супендируют в 10 мл бидистиллированной воды. Споры отделяют с поверхности культуры стеклянным шпателем, переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют промывая не менее 4 раз.

1.9.3.3. Подтверждение чистоты штамма

Проверку чистоты производят путем посева штамма на одну или несколько чашек с соответствующей питательной средой, а также микроскопически.

Идентичность штамма должна подтверждаться посредством актуальных идентифицирующих методов.

1.9.3.4. Приготовление испытательных суспензий

Приготовление культуры бактерий (кроме микобактерий)

Бактериальный или дрожжевой рост на поверхности питательной среды рабочей культуры с помощью стеклянного шпателя суспендируют в 10 мл применяемого для разведения средства (см. Приложение А.1.3.). Более крупные частицы удаляют осаждением или фильтрацией через стекловолоконную вату. Количество КОЕ в испытательной суспензии подходящими методами при использовании разбавителя доводят до $1{,}5x10^9$-$8x10^9$/мл (от $1{,}5x10^8$ до $8x10^8$ мл для дрожжей). Эту суспензию следует сохранять при 20±1°С и использовать в течение 2 часов. Непосредственно перед проведением теста необходимое количество суспензии должно быть доведено до температуры, при которой проводится тест.

Приготовление культуры плесневых грибов

Конидии, отделенные с поверхности питательного агара с помощью стеклянного шпателя, суспендируют в 10 мл разбавителя. Эту суспензию слегка встряхивают в течение 1 минуты в стеклянной колбе (100 мл) с 5-10 г стеклянных бусин диаметром 3-4 мм, а затем фильтруют.

Посредством микроскопического исследования непосредственно после приготовления испытательной суспензии или незадолго до проведения теста, если суспензия используется дольше 4 часов, должно быть подтверждено отсутствие фрагментов мицелия и прорастания спор. Эти явления должны наблюдаться менее, чем в одном из десяти счетных участков.

Использование суспензии с проросшими спорами не допускается.

В случае обнаружения мицелия, отфильтрованную суспензию центрифугируют 20 мин. при 2000 об./мин., осаждают и повторно суспендируют для вымывания мицелия с помощью разбавителя. Этот процесс повторяют до тех пор, пока не будет установлено отсутствие мицелия, но не менее двух раз.

Количество спор в испытательной суспензии доводится до (1,5-8,0)x10^8/мл, после чего суспензия может использоваться в течение 2 дней при температуре хранения 2-8°С. Перед употреблением испытательную суспензию необходимо встряхивать.

Приготовление культуры Trichophyton mentagrophytes

Выросшие на среде Сабуро микроорганизмы переносят в пробирки с 10 мл NaCl и стеклянными бусинами, гомогенизируют в пробирках. Контролируемая суспензия должна содержать от 10^7 до 10^8 КОЕ/мл.

Приготовление культуры микобактерий

Поверхностный рост рабочей культуры смывают в 10 мл бидистиллированной воды, трехкратно центрифугируют 15 мин. при 2000 об./мин. и промывают осадок в бидистиллированной воде. После последнего центрифугирования осадок разводят в 5 мл бидистиллированной воды и гомогенизируют.

Количество КОЕ в суспензии должно быть в пределах (1,5-8,0)х10^9/мл. Эта суспензия, разделенная на порции по 2 мл, при хранении 2-8°С может использоваться в течение пяти дней. Перед использованием испытательную суспензию необходимо встряхивать.

Приготовление культуры Bacillus subtilis, Bacillus cereus

Выросшие на поверхности МПА и КСА споровые микроорганизмы с помощью шпателя суспендируют 10 мл применяемого для разведения средства (см. Приложение А.1.3.). Более крупные частицы удаляют осаждением или фильтрацией. Суспензию помещают в пробирки, центрифугируют при 2000 об./мин. 20 мин., промывают не менее 4 раз. Количество спор КОЕ в испытательной суспензии доводят до (1,5-8,0)х10^6. Суспензию переносят во флакон и нагревают на водяной бане при 75°С в течение 10 мин. При помощи микроскопирования необходимо убедится в отсутствии вегетативных клеток и прорастании спор. Суспензию можно использовать в течении 2 дней при температуре хранения 2-8°С.

Определение исходного числа микроорганизмов

Подготовленные испытательные суспензии с помощью разбавителя доводят до 10^2-10^3 КОЕ/мл. Суспензию гомогенизируют. По 0,1 мл разбавленной суспензии берут для контрольного определения, засевают поверхностным методом и инкубируют при 36±1°С (Candida albicans в течение 42-48 часов, Aspergilla niger, Trichofiton mentagrophytes, Bacillus subtilis – в течение 7-9 дней; M. terrae – в течение 21 дня). Для предохранения от высыхания питательные среды следует заклеить или поместить в полиэтиленовые пакеты.

Количество КОЕ на каждой питательной среде подсчитывают.

1.9.4. Проведение тестов in vitro

1.9.4.1 Определение бактериостатической и микостатической эффективности, а также пригодности нейтрализущих средств

Поиск пригодного нейтрализующего средства является обязательным условием для всех экспериментов.

Микроорганизмы, используемые при тестировании:

– Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799);

– Enterococcus faecitum ATCC 6057 (ДСМ 2146);

– Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320);

– Escherichia coli K12 НСТС10538;

– Escherichia coli ATCC 11229;

– Proteus mirabilis ATCC 14153 (ДСМ 788);

– Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939);

– Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386).

Приготовление исходных, рабочих и испытательных суспензий описано в разделе 1.9.3.

Подготовка проверяемого раствора средства

Приготовление раствора проверяемого продукта описаны в разделе 1.9.1.

Методика проведения испытания

В пробирках смешивают по 5 мл растворов проверяемого средства в тех отношениях, в каких они используются в тестах приближенных к практическим условиям (например, при химико-термической дезинфекции белья), в воде стандартной жесткости с 5 мл КСР или КСР + нейтрализующее средство (см. Приложение А.1.7.) двойной концентрации.

Для определения бактериостатической эффективности в пробирки засевают используемые в тестах микроорганизмы в количестве 0,1 мл испытательной суспензии, разведенной КСР в отношении 1:10. Для проверки микостатической эффективности используют 0,1 мл неразведенной испытательной суспензии Candida albicans. Учет результатов производят после 48-часовой инкубации при 36±1°С (Candida albicans при 30±1°С – 72 часа).

Оценка полученных результатов

Сравнение темпов замедления роста в сериях тестов без добавления и с добавлением нейтрализующего средства, дает сведения о его эффективности. Мерой замедляющей размножение эффективности (угнетающая концентрация) считается наибольшее разбавление продукта в КСР или в КСР + нейтрализующее средство, которое после 48 часов инкубации настолько подавляет рост микроорганизмов, что не происходит помутнения суспензии («+» – соответствует росту микроорганизмов; «–» – соответствует отсутствию роста микроорганизмов).

Если для различных испытательных микроорганизмов потребуются различные нейтрализующие средства, то для каждого микроорганизма следует использовать наиболее приемлемое средство. Определенные таким образом нейтрализующие средства необходимо использовать во всех последующих тестах (тесты «in vitro» и тесты в условиях, приближенных к практическим), за исключением испытаний с использованием M. terrae.

1.9.4.2 Определение бактерицидной, фунгицидной и спороцидной эффективности в качественном эксперименте с суспензией

Примечание: данное исследование необходимо тогда, когда в последующем количественном эксперименте с суспензией должны проверяться не все заданные микроорганизмы, а только некоторые наиболее стойкие грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы те, что не имеют значения при оценке эффективности проверяемого способа дезинфекции. Данный метод может быть полезен для облегчения работ при определении диапазона эффективных концентраций.

Микроорганизмы, используемые при тестировании

- Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799);
- Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320);
- Escherichia coli ATCC 11229;
- Proteus mirabilis ATCC 14153 (ДСМ 788);
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939);
- Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386);
- Aspergilla niger ATCC16404 (ДСМ 1988);
- Trichofiton mentagrophytes A TCC 3533 (ДСМ 4870);
- Bacillus subtilis cip 7803 (шт96)
- Bacillus cereus cip 7718 (ATCC 9372).

Приготовление рабочих культур, и испытательных суспензий описаны в разделе 1.10.3.

Подготовка проверяемого раствора средства, приготовление раствора проверяемого продукта описаны в разделе 1.9.1.

Методика проведения испытания

0,1 мл испытательной суспензии смешивают с 10 мл соответствующего, раствора дезинфекционного средства в воде

стандартной жесткости. После инкубации в течение необходимого времени взвесь микроорганизмов с проверяемым средством снова перемешивают. Отбирают по 0,1 мл и переносят в 10 мл КСР (при необходимости с нейтрализующим средством, определенным в соответствии с подразделом 1.10.4). Эти субкультуры инкубируют в течение 48 часов при 36±1°С (Candida albicans при 30±1°С – 72 часа, Bacillus subtilis – 7-8 дней).

Оценка полученных результатов

По помутнению бульонных культур можно установить наличие роста («+» – соответствует росту микроорганизмов; «–» – соответствует отсутствию роста микроорганизмов).

После этого необходимо провести регистрацию эффективных и неэффективных соотношений концентрации и времени воздействия для всех испытательных микроорганизмов.

1.9.4.3. Количественный суспензионный метод с использованием бактерий (кроме микобактерий) и грибов

Концентрации, необходимые для проведения опыта исходят из результатов качественных экспериментов с суспензиями.

Микроорганизмы, используемые при тестировании:

- Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799);
- Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320);
- Enterococcus faecium ATCC 6057 (ДСМ 2146);
- Escherichia coli ATCC 11229 (K12 HCTC1053);
- Proteus mirabilis ATCC 14153 (ДСМ 788);
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939);
- Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386).

В тестах следует проверить по меньшей мере одну грамотрицательную и одну грамположительную бактерию или Candida albicans. Среди грамотрицательных и грамположительных в каждом случае следует выбирать наиболее устойчивый микроорганизм по результатам качественных экспериментов с суспензиями.

Для методов, протекающих при температурах выше 60°С следует выбирать исключительно Enterococcus faecium.

Приготовление исходных и рабочих культур, а также испытательных суспензий описаны в разделе 1.9.3.

Приготовление раствора проверяемого продукта описаны в разделе 1.9.1.

Методика проведения испытания

В образец подлежащего проверке дезсредства вносится бактериальная или суспензия грибов и выдерживается при 20±1°С в течение различных экспозиций. После выбранных или установленных экспозиций кратное количество смеси немедленно нейтрализуют соответствующим способом, чтобы проверить бактерицидность или фунгицидность. В каждом образце определяют количество живых микроорганизмов и вычисляют их сокращение.

Способом подбора является способ разбавления и нейтрализации, но только в том случае, когда подходящее средство нейтрализации не найдено, допускается применение метода мембранной фильтрации.

Испытания с белковой нагрузкой определяются условиями использования проверяемого продукта.

Порядок проведения испытания:

а) метод разбавления и нейтрализации

При проведении испытания без белковой нагрузки 0,1 мл испытуемой суспензии хорошо смешивают с 9,9 мл раствора

проверяемого средства. После истечения необходимой экспозиции смесь проверяемого раствора и микроорганизмов снова тщательно перемешивается и 0,5 мл переносится в 4,5 мл средства, служащего для разведения (см. Приложение А.1.3.) (при необходимости с определенным нейтрализующим средством). После нейтрализации в течение 5 мин.±10 сек. готовят разведения от 10^{-1} до 10^{-3}. Затем производят посев шпателем на КСА (C. albicans – на СЭА) из смеси с нейтрализатором и разведений по 0,1 или 0,5 мл. Из каждого разведения делают по 2 высева.

Для контроля соответствующую испытательную суспензию вместо проверяемого раствора продукта смешивают с 9,9 мл ВСЖ (контрольная проверка 1). После истечения необходимой экспозиции готовят разведения и высевы на соответствующие питательные среды.

Чашки инкубируют в течение 42-48 часов при 36±1°С (Candida albicans при 30±1°С – 72 часа). Для установления влияния белковой нагрузки количественный эксперимент с суспензией проводят с проверяемыми растворами продукта, содержащими 0,03% альбумина или 20% лошадиной сыворотки (см. Приложение А.1.В.), которые добавляют непосредственно перед началом эксперимента. Для проведения сравнения между экспериментами с белковой нагрузкой и без нее, эти исследования проводят в параллелях.

Для имитации повышенного органического загрязнения количественный эксперимент проводят с растворами проверяемого средства, которые содержат 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов (см. Приложение А.1.8.), которые также добавляют непосредственно перед началом эксперимента. Для оценки влияния дополнительной нагрузки эти исследования также проводят в параллелях.

б) метод мембранной фильтрации

При проведении испытания без белковой нагрузки 0,1 мл испытательной суспензии хорошо смешивают с 9,9 мл раствора проверяемого дезинфекционного средства. После истечения необходимой экспозиции смесь проверяемого раствора с микроорганизмами снова хорошо перемешивают переносят по 0,5 мл на два отдельных мембранных фильтра установки для фильтрации содержащей 50 мл промывочной жидкости (см. Приложение А. 1.5.) и затем фильтруют. При этом не следует превышать временной интервал 1 мин., отводимый на перенос и фильтрование. Промывку производят не менее чем 150 мл и не более чем 500 мл промывочной жидкости. Затем мембраны переносят на диагностические питательные среды так, чтобы не было попаданий воздуха между мембраной и поверхностью питательной среды.

Примечание: при испытании дезинфицирующего мыла итоговые количества бактериальных колоний не поддаются учету, поэтому необходимо проводить соответствующее разбавление растворов с помощью промывочной жидкости.

Для контроля 0,1 мл испытательной суспензии смешивается с 9,9 мл ВСЖ (контрольная проверка 1). После необходимой экспозиции и соответствующего предварительной: разбавления образца промывочной жидкостью суспензию фильтруют описанным выше методом.

После истечения экспозиции проводят растительную до 10^{-4}-10^{-5}, и 0,5 мл переносят не мембрану фильтра.

Чашки инкубируют в течение 42-48 часов при 36±1°С (Candida albicans при 30±1°С – 72 часа). Эксперименты с белковой нагрузкой и

повышенным органическим загрязнением проводя: также, как и в способе разбавления и нейтрализации.

Контроль нейтрализации (контрольная проверка 2) и нетоксичность нейтрализующего средства (контрольная проверка 3)

Контроль нейтрализации проводят следующим образом: к 1 мл проверяемого дезсредства взятого в максимальной концентрации, добавляют 9 мл нейтрализатора и через 5 мин. ±10 с добавляют 0,1 мл 10 кратного разведения (для Candida albicans 10^{-3}) испытываемой суспензии. Через 60 мин. по 0,1 мл засевают на 2 чашки соответствующей среды. Также по 0,1 мл засевают на 2 чашки из разведения суспензии 10^{-1} на соответствующие питательные среды и инкубируют в термостате при 36±1°С в течение 24-48 часов.

Примечание: если в эксперименте окажется недостаточная нейтрализация, то в воспроизведении по всем соотношениям концентрации продолжительности воздействия должны быть приготовлены контрольные проверки 2.

Контроль токсичности нейтрализатора проводится, как и контроль нейтрализации, только вместо раствора проверяемого средства берется ВСЖ.

Обработка результатов

Учитывают чашки, на которых количество КОЕ лежит в пределах между 15 и 300 и подсчитывают число колоний в опыте и контроле. После вычисления среднего арифметического из дублирующих определений, рассчитывают фактор редукции (RF) по формуле:

1ogRF= 1og (КОЕ Ко) - 1og (КОЕ D),

где: КОЕ Ко – количество КОЕ на мл без воздействия средства;

КОЕ D – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

Значения КОЕ по степеням разведения контрольных проверок 2 и 3 должны быть противопоставлены значениям КОЕ степеней разведения испытательной суспензии.

При оценке эффективности дезинфицирующих средств критерием эффективности обеззараживания является снижение количества микроорганизмов не менее чем на 5lg.

1.9.4.4. Количественный суспензионный метод с использованием микобактерий

Микроорганизмы и средства, используемые при тестировании:

– Mycobacteria terrae ATCC 15755 (ДСМ43227);

– Mycobacteria smegmatis cip 7326;

– Mycobacteria avium ATCC 15769 (ДСМ 44157).

Приготовление исходных, рабочих и испытательных суспензий см. в разделе 1.9.3.

Рекомендуется использовать указанные нейтрализующие средства:

а) для фенольных дезинфекционных средств – полисорбат-80 – 1%, сапонин 3%, лецитин 0,3% в фосфатном буфере (pH7);

б) для остальных дезинфицирующих средств – полисорбат-80 – 1%, сапонин 3%, тиосульфат натрия 0,5%, Л-Гистидин 0,1% в фосфатном буфере (pH7);

Приготовление раствора проверяемого продукта описано в разделе 1.9.1.

Методика проведения испытания

Образец подлежащего проверке средства соединяется с микобактериальной суспензией и эта смесь выдерживается при 20°C. После выбранных и зафиксированных экспозиций кратное количество смеси нейтрализуют соответствующим обоснованным способом для

проверки существующей туберкулоцидности (M. terrae) или микобактерицидности (M. avium). В каждом образце определяют количество живых микроорганизмов и рассчитывают их фактор редукции.

Способом подбора является способ разбавления-нейтрализации. Эксперименты с органической нагрузкой определяются условиями применения исследуемого дезинфекционного средства.

Порядок проведения испытания

При проведении испытания без органической нагрузки 0,1 мл испытуемой суспензии тщательно перемешивают с 9,9 мл раствора проверяемого средства. По истечении необходимой продолжительности воздействия смесь проверяемого раствора с микроорганизмами вновь суспендируют, отбирают по 0,5 мл и переносят в 4,5 мл нейтрализующего средства – проверочная нейтрализующая смесь. После нейтрализации в течение 5 мин.±10 сек. готовят разведения растворов (от 10^{-1} до 10^{-3}). Затем по 0,1 мл из нейтрализующей смеси и разведений засевают при помощи шпателя на соответствующие питательные среды (по 2 чашки на каждое разведение).

Для контроля испытательную суспензию смешивают не с раствором проверяемого средства, а с 9,9 мл ВСЖ (контрольная проверка 1). После необходимой экспозиции посевы на питательные среды проводят также, как и в опыте.

Для предохранения от высыхания чашки Петри заклеивают, или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 21 дня при 36±1°С.

Описание эксперимента с белковой нагрузкой и повышенным органическим загрязнением смотри в пп. 1.9.4.3 (порядок проведения испытаний).

Контроль нейтрализации (контрольная проверка 2) и нетоксичности нейтрализующего средства (контрольная проверка 3)

В качестве (контрольной проверки 2) 1 мл проверяемого продукта в максимальной использованной в эксперименте концентрации смешивают с 9 мл нейтрализующего средства и после нейтрализации в течение 5 мин.±10 сек. соединяют с 0,1 мл 10^{-4} разведения испытательной суспензии. После инкубации в течение 60 мин. отсюда, как и из непосредственного состава, а также из 10^{-1} разведения в нейтрализующем средстве шпателем наносят по 0,1 мл на Middlebrok агар способом дублированного определения.

Примечание: если в эксперименте проявится недостаточная нейтрализация, то в воспроизведении по всем соотношениям концентрации – продолжительности воздействия должны быть приготовлены контрольные проверки 2.

Контрольная проверка 3 производится аналогично контрольной проверке 2, но вместо раствора проверяемого средства берется ВСЖ.

Обработка результатов

Учитывают чашки, на которых количество КОЕ лежит в пределах между 15 и 300 и подсчитывают число колоний в опыте и контроле. После вычисления среднего арифметического из дублирующих определений, рассчитывают фактор редукции (RF) по формуле:

$$1ogRF=1og\ (КОЕ\ Ко) - 1og\ (КОЕ\ D),$$

где:

КОЕ Ко – количество КОЕ на мл без воздействия средства;

КОЕ D – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

Значения КОЕ по степеням разведения контрольных проверок 2 и 3 должны быть противопоставлены значениям КОЕ степеней разведения испытательной суспензии.

При оценке эффективности дезинфицирующих средств критерием эффективности обеззараживания является снижение количества микроорганизмов не менее чем на 5lg.

1.9.4.5. Качественный эксперимент противомикробной активности дезинфектантов с использованием тест-носителей (резиновые трубки)

Микроорганизмы, используемые при проведении эксперимента:

- Staphylococcus aureus ATTC 6538 (ДСМ 799);
- Enterococcus hirae ATCC 10541 (ДСМ 3320);
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 (ДСМ 939);
- Mycobacteriит terrae ATCC 15755 (ДСМ43227);
- Mycobacteriит avium ATCC 15769 (ДСМ 44157);
- Candida albicans ATCC 10231 (ДСМ 1386);
- Bacillus subtilis cip 7803;
- Bacillus cereus cip 7718 (ATCC 9372).

Приготовление исходных и рабочих культур описаны в разделе 1.9.3.

Требования к препарату.

Препарат для химической дезинфекции инструмента должен вызывать полную гибель тест-микроорганизмов на всех обрезках шланга.

Подготовка проверяемого раствора средства.

Приготовление раствора проверяемого продукта описаны в разделе 1.9.1.

Подготовка тест-носителей.

Обрезки ранее неиспользованного шланга величиной 1 см (Приложение А2) кипятят в течение 10 мин. в бидистиллированной воде, после чего просушивают.

Для заражения обрезков шланга приготавливают культуры в КСР (для C.albicans в СЭБ) которые инкубировались в течение 24 часов при 36±1°С (для C.albicans – 48 часов при 30±1°С, для Bacillus subtilis, Bacillus cereus на МПА – 7-9 суток при 30±1°С). Сразу перед началом проведения эксперимента к этим культурам примешивают дефибринированную овечью кровь в окончательной концентрации 20%. Количество живых микроорганизмов этой испытательной суспензии (от 1,5-5x10^8 КОЕ/мл) выявляется посредством поверхностной культуры на КСА (МПА) и, соответственно, СЭА (C.albicans).

Подготовленные обрезки шланга (по 3 на каждую экспозицию и микроорганизм помешают в суспензию, после нескольких поворачиваний устанавливают стерильным пинцетом вертикально на фильтровальную бумагу и просушивают 4 часа при 36±1°С.

Порядок проведения эксперимента.

Обрезки шланга, погружают в раствор проверяемого продукта и по истечении выбранных и зафиксированных экспозиций переносят в питательную среду раствор (при необходимости с нейтрализующим средством) и инкубируют. Руководствуясь наличием или отсутствием роста в пробирках с культурами, определяют эффективные и неэффективные соотношения концентрации и экспозиции.

На каждый микроорганизм берут по 12 обрезков шланга, укладывают в чашки и заливают по 30 мл раствора проверяемого дезсредства. Через 15, 30, 45 и 60 мин. экспозиции при 20°С, пинцетом извлекают по три обрезка и по отдельности промывают в 10 мл нейтрализатора на каждый обрезок. Затем каждый обрезок шланга переносят в пробирку для культивирования с 10 мл КСБ (СКС) (C.albicans – СЭБ).

В качестве контрольной проверки, зараженные обрезки шланга вместо раствора проверяемого продукта обрабатывают ВСЖ и после 60 мин. воздействия исследуют как описано выше.

При контроле нейтрализации для каждого микроорганизма один зараженный обрезок шланга смачивают раствором проверяемого продукта, индивидуально промывают в 10 мл КСБ (СКС) (C.albicans в СЭБ), при необходимости с нейтрализующим средством. В каждую пробирку добавляют по одному обрезку шланга зараженного соответствующим микроорганизмом.

Оценка контроля нейтрализации заключается в том, что во всех контрольных пробирках после инкубации должен наблюдаться рост. Пробирки с культурами инкубируют в течение 7 дней при 36±1°С (C.albicans – при 30±1°С).

Обработка результатов.

После инкубирования пробирки с культурами исследуют на наличие роста.

1.9.4.6. Методы испытания противомикробной активности средств для хирургической и гигиенической обработки рук

Испытания противомикробной активности проводят «in vivo», оценивая уровень активности по фактору редукции, величина которого показывает разницу между десятичными логарифмами числа микробов на коже рук пробантов до и после обрабортки.

Метод испытания противомикробной активности средств для хирургической обработки рук.

1 этап.

Пробанты моют руки теплой проточной водой с жидким мылом в течение 2 минут, высушивают руки на воздухе или стерильными

салфетками. После высыхания кожи рук, выполняют смывы с двух дистальных фаланг четырех пальцев каждой руки в стерильных чашка Петри с 10 мл нейтрализатора. Смывы проводят путем тщательного потирания пальцами о дно чашки Петри в течение 1 мин.

Готовят разведения смывной жидкости на физиологическом растворе до 10^{-4}. По 1 мл каждого разведения засевают на КСР (МПА) глубинным методом. Посевы инкубируют 48 часов при температуре 36±1°С.

2 этап.

Пальцы рук смывают теплой проточной водой для удаления раствора нейтрализатора и высушивают на воздухе. Затем обрабатывают кисти рук средством в соответствии с инструкцией по применению средства. После этого проводят смывы с пальцев рук в 10 мл раствора нейтрализатора.

Готовят разведения смывной жидкости на физиологическом растворе до 10^{-3}. По 1 мл каждого разведения и цельной смывной жидкости засевают на КСР (МПА) глубинным методом. Посевы инкубируют 48 часов при температуре 36±1°С.

3 этап.

Подсчитывают число колоний микробов до обработки и после обработки, определяют КОЕ/мл и десятичные логарифмы числа выживших микробов.

Рассчитывают фактор редукции (RF) по формуле:

1ogRF= 1og (КОЕ Ко – 1og (КОЕ К1),

где:

КОЕ Ко – количество КОЕ мл без воздействия средства;

КОЕ К1 – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

Метод испытания противомикробной активности средств для гигиенической обработки рук.

1 этап.

Пробанты моют руки теплой проточной водой и высушивают руки на воздухе или стерильными салфетками. Далее пробанты контаминируют пальцы рук тест-культурой Escherichia coli ATCC 11229 путем опускания пальцев на 1 мин. в стакан со взвесью тест-культуры на физиологическом растворе плотностью 10^9 КОЕ/мл. Руки высушивают на воздухе до полного высыхания. После высыхания кожи рук, выполняют смывы с двух дистальных фаланг четырех пальцев каждой руки в стерильных чашка Петри с 10 мл нейтрализатора. Смывы проводят путем тщательного потирания пальцами о дно чашки Петри в течение 1 мин.

Готовят разведения смывной жидкости на физиологическом растворе до 10^{-6}. По 1 мл каждого разведения засевают на чашки со средой Эндо. Посевы инкубируют 24 часа при температуре 36±1°С.

2 этап.

Затем обрабатывают кисти рук средством в соответствии с инструкцией по применению средства. После этого в течение 1 мин. проводят смывы с пальцев рук в 10 мл раствора нейтрализатора.

Готовят разведения смывной жидкости на физиологическом растворе до 10^{-3}. По 1 мл каждого разведения и цельной смывной жидкости засевают на среду Эндо. Посевы инкубируют 24 часа при температуре 36±1°С.

3 этап.

Подсчитывают число колоний микробов до обработки и после обработки, определяют КОЕ/мл и десятичные логарифмы числа выживших микробов.

Рассчитывают фактор редукции (RF) по формуле:

1ogRF=1og (КОЕ Ко) – 1og (КОЕ К1),

где: КОЕ Ко – количество КОЕ мл без воздействия средства;

КОЕ К1 – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

Критерии оценки.

Средство считается эффективным для хирургической обработки если в опыте «in vivo» вызывает фактор редукции постоянной и заносной микрофлоры ≥ 2 log.

Средство считается эффективным для гигиенической обработки если в опыте «in vivo» вызывает фактор редукции тест-культуры кишечной палочки ≥ 4 log.

Приложение А

А.1. Культуральные среды и реактивы.

Перед началом проведения эксперимента все среды и реактивы (вода, раствор проверяемого препарата, испытательная суспензия, нейтрализующее средство и т.д.) должны быть на водяной бане доведены до температуры проведения опыта 20°С. Постоянство температуры необходимо контролировать.

При проведении исследований все реактивы должны быть чистыми для анализа и пригодными для микробиологического использования. Необходимо строго соблюдать указания изготовителя по их использованию.

А.1.1. Вода.

Свежедистиллированную воду стерилизуют 20 минут при 121°С.

А.1.2. Вода стандартной жесткости.

– 17,5 мл 10% раствора $CaC1_2$ х H_2O;

– 5 мл 10% раствора $MgSO_4$ х $7H_20$;

– долить до 3300 мл, стерилизовать паром при 121°С;

– pH – 7,2±0,2 при 20°С;

Или:

раствор А:

– 19,84 г $MgCl_2$ (безводный);

– 46,24 г CaCl2 (безводный).

Растворить в дистиллированной воде и долить до 1000 мл, стерилизовать паром при 121°С 20 мин.

раствор В:

– 35,02 г NaHCOз

Растворить в дистиллированной воде и долить до 1000 мл, стерилизовать фильтрацией (размер пор фильтра 0,22 мкм).

В стерильной колбе (1000 мл) к 6 мл раствора А добавить не менее 600 мл стерильной очищенной воды, добавить 8 мл раствора В, долить до 1000 мл стерильной дистиллированной водой.

Окончательная жесткость должна составлять 300 мг/кг $CaCO_3$, показатель pH=7±0,2 при 25°С. Доводить pH нужно либо 1-нормальным раствором NaOH или 1-нормальным раствором HCl. Вода для экспериментов должна быть свежеприготовленной и использоваться не более 7 дней при хранении с температурой от 2 до 8°С.

А.1.3. Средство для разведения растворов.

Пептон из казеина, переваренный трипсином – 1 г;

NaCl – 8,5 г;

Дважды дистиллированная вода – до 1000 мл.

Растворить и стерилизовать паром 20 мин. при 121°С.

pH = 6,9±0,2 при 20°С

А.1.4. Питательные среды.

Питательный раствор:

Экстракт мяса КРС – 30 г;

Пептон из казеина, переваренный трипсином – 5 г;

Вода дважды дистиллированная – 1000 мл.

Растворить и стерилизовать паром 20 мин. при 121°С.

pH – 6,9±0,2 при 20°С.

Защитный раствор:

Приготовить питательный раствор и перед стерилизацией паром добавить 150 г глицерина на литр.

Агар Middelbrook:

Агар Middelbrook – 19 г;

глицерин – 5 мл;

вода дважды дистиллированная – до 900 мл.

Растворить, стерилизовать паром при 121°С в течение 20 мин. и охладить до 50-55°С; добавить 100 мл питательного компонента OADC в стерильных условиях и смешать.

pH = 6,6±0,2 при 25°С.

КСА:

Пептон из казеина, триптически переваренный – 15 г;

соевый пептон, папаиновая выработка из соевой муки – 5 г;

NaCl – 5 г;

агар – 15 г;

дважды дистиллированная вода – до 1000 мл.

Растворяют и в течение 20 мин., стерилизуют паром при 121°С.

pH = 7,2±0,2 при 20°С.

КСР:

Пептон из казеина, триптически переваренный – 15 г;

соевый пептон, папаиновая выработка из соевой муки – 5 г;

NaCl – 5 г;

вода дважды дистиллированная – до 1000 мл.

Растворить и стерилизовать паром в течение 20 мин. при 121°С. pH 7,2±0,2 при 20°С.

СЭА:

Солодовый экстракт – 30 г;

соевый пептон – 3 г;

агар – 15 г;

вода, дважды дистиллированная – до 1000 мл.

Растворить и стерилизовать паром в течение 20 мин. при 121°С.

pH = 5,6±0,2 при 20°С.

СЭБ:

Солодовый экстракт (технической чистоты) – 20 г;

Вода, дважды дистиллированная – до 1000 мл.

Растворить и стерилизовать паром в течение 20 мин. при 121°С.

pH = 5,6±0,2 при 20°С.

Сабуро, МПА, МПБ, СКС – готовить согласно прописи инструкции по применению.

А.1.5. Промывочные жидкости

В качестве промывочных жидкостей нужно брать все жидкости, которые стерильны:

- вода;
- средство для разбавления;
- полисорбат-80 (0,1% об. в водном растворе);
- полисорбат-80 (0,5% об. в водном растворе);
- полисорбат-80 (0,5% об. в водном растворе) плюс 0,7 г/л лецитина;
- нейтрализующее средство;
- буферные растворы.

А.1.6. Нейтрализующие средство

Для каждого исследуемого продукта должно быть выбрано соответствующее нейтрализующее средство, которое должно быть стерильным.

Ниже в качестве примера даются некоторые комбинации:

– полисорбат-80 – 30 г/л, сапонин – 30 г/л, L-гистидин – 1 г/л, лецитин – 3 г/л, тиосульфат натрия – 5 г/л, 0,0025 М фосфатный буфер довести до 1000 мл;

– полисорбат-80 – 30 г/л, лецитин – 0,3 г/л, L-гистидин – 0,1 г/л, CAS0-бульон – 30 г/л, вода, дважды дистиллированная – довести до 1000 мл;

– полисорбат-80 – 30 г/л, лецитин – 3 г/л, L-гистидии – 1 г/л, тиосульфат натрия – 5 г/л, сапонин – 30 г/л, вода – довести до 1000 мл средством для разведения растворов (п. А.1.3);

– полисорбат-80 – 30 г/л, лецитин – 3 г/л, L-цистеин – 1 г/л, сапонин – 30 г/л, вода, дважды дистиллированная – довести до 1000 мл;

– полисорбат-80 – 30 г/л, лецитин – 3 г/л, L-цистеин – 1 г/л, тиосульфат натрия – 5 г/л, сапонин – 30 г/л, вода, дважды дистиллированная – довести до 1000 мл;

– бета-Циклодекстрин – 10 мл, сапонин – 30 г/л, вода, дважды дистиллированная – довести до 1 000 мл;

– полисорбат-80 – 10 г/л, сапонин – 30 г/л, лецитин – 3 г/л, 15 М фосфатный буфер – довести до 1000 мл;

– полисорбат-80 – 10 г/л, сапонин – 30 г/л, тиосульфат натрия – 5 г/л, L-гистидин – 1 г/л, 15 М фосфатный буфер – довести до 1000 мл:

– фосфатный буфер 0,25 моль/л, KH_2PO_4 – 34 г, вода дважды дистиллированная – довести до 1000 мл.

Все нейтрализующие средства доводят до pH 7±0,2 и стерилизуют паром в течение 20 мин. при 121°C.

А.1.8. Белковые нагрузки

а) Белковая нагрузка:

0,3 г альбумина из сыворотки крови КРС (фракция V) растворить в 100 мл средства для разведения (см. А.1.3.) и стерильно фильтровать (окончательная концентрация 0,3% альбумина).

б) Имитация повышенного органического загрязнения:

3,0 г альбумина из сыворотки крови КРС (фракция V) растворяют в 97 мл средства для разведения растворов (см. А 1.3) и стерильно фильтруют (окончательная концентрация альбумина 3%).

В заключение добавить 3 мл раствора бараньих эритроцитов (приготовление см. ниже).

Окончательная концентрация бараньих эритроцитов 3%.

20% лошадиная сыворотка.

Приготовление бараньих эритроцитов: 8 мл свежей дефибринированной овечьей крови центрифугируют при 800 об./мин. в течение 10 мин. Жидкость над осадком слить, а осадок развести в таком же объеме средства для разведения (см. А.1.3.).

Процесс повторить три раза, пока жидкость над осадком не станет бесцветной. Промытые таким образом эритроциты использовать для приготовления белковых нагрузок.

2. Энтомологические и акарологические методы исследований и критерии оценки эффективности дезинсекционных средств

2.1. Общие положения. Организация экспериментов.

2.1.1. Общие положения

При разработке и изучении средств медицинской дезинсекции необходимо учитывать то, что членистоногие, имеющие эпидемиологическое и санитарно-гигиеническое значение, являются представителями двух классов (насекомых и паукообразных), относятся к разным отрядам и семействам, обитающим в разных в различных экосистемах.

Более того, насекомые делятся на две большие группы: с неполным превращениям и полным превращением. У насекомых с неполным превращением личинки и нимфы внешне похожи на имагинальную стадию, отсутствует стадия куколки, и они обитают в тех же условиях, что и взрослые. У насекомых с полным превращением кроме стадии яйца и личинки имеется стадия куколки, и личинки совершенно не похожи на взрослое насекомое, обитают и развиваются в иной среде. Типичным примером насекомого с полным типом превращениям являются комары, у которых личинки развиваются в водной среде, а имаго живут на суше. Кроме того, для членистоногих присуща как видовая чувствительность к различным химическим веществам и физическим факторам, так и разная чувствительность стадий развития. Разные виды членистоногих по-разному реагируют на химические стимулы, отпугивающие или привлекающие их.

В связи со сказанным выше, разнообразны как вещества (физические, биологические факторы) убивающие членистоногих или воздействующие на процессы их роста и развития, отпугивающие или

привлекающие их, так и препаративные формы, которые наиболее приемлемы для применения в различных биотопах с целью подавления представителей типа членистоногих, и разнообразны методы изучения действующих веществ (субстанций) и препаративных форм на их основе (препараты, средства).

Ниже излагаются методы, применяемые для выявления и изучения инсектицидных, акарицидных (инсектоакарицидных), репеллентных и рострегулирующих свойств химических веществ, физических и биологических агентов и средств на их основе.

2.1.2. Организация экспериментов

В зависимости от необходимости установления инсектицидных, акарицидных или других типов действий у веществ, которые не имеют таковой характеристики, проводят исследования на ограниченном количестве лабораторных культур насекомых и клещей в выбранной в зависимости от класса химических веществ концентрации или дозе.

При выявлении той или иной активности проводят углубленные исследования, увеличивая количество биообъектов, используя серии концентраций или доз.

При оценке активности описанных веществ их активности выявляют в экспериментах параллельно с эталонным образцом такого же вещества, биообъекты и методы испытаний выбирают в зависимости от целевой активности.

Оценку активности средств (препаратов) проводят на лабораторных культурах членистоногих, а также на природных популяциях членистоногих в лабораторных или натурных экспериментах в различных режимах применения.

2.1.3.Тест-членистоногие, используемые в экспериментах

Членистоногие, используемые в экспериментах, могут культивироваться в лаборатории или отлавливаться в природных биотопах. Кроме того, могут быть использованы модельные объекты, которые легко культивировать в лаборатории, но данные, полученные на этих объектах могут быть перенесены на другие целевые виды. Такое перенесение возможно только после проведения многократных экспериментов и получения достоверно сходимых данных.

В лабораторных условиях культивируют:

Класс насекомые Insecta:

– отряд тараканових: рыжие тараканы Blattella germanica L., американские тараканы Periplaneta americana L. (международные тест-объекты) и черные тараканы Blatta orientalis L. В экспериментах используют самок до выдвижения оотеки, самцов 3-21 дневного возрастов и личинок разных возрастов. При изучении кишечного действия инсектицидов в опытах используют голодных тараканов, которым за 12 часов до опыта дают только воду, но не дают пищи;

– отряд полужесткокрылых: постельный клоп Cimex lectularius L. В экспериментах используют самцов и самок 5-дневного возраста, накормленных за 3 часа до опыта на морских свинках, кроликах или белых мышах, яйца 3-5-дневные;

– отряд вшей: платяные вши Pediculus humanus corporis De Geer. В эксперименте используют имаго (самки, самцы 15-дневного возраста, накормленные не ранее чем за 1 час до опыта), личинок 3-го возраста, яйца любых возрастов в зависимости от целей эксперимента. Платяные вши легче культивируются в лабораторных условиях, они более устойчивы к инсектицидам, чем головные и лобковые, поэтому данные,

получаемые на этом объекте, можно переносить на два других вида вшей;

– отряд перепончатокрылых: рыжий домовый муравей Monomorium pharaonis L. В эксперименте используют рабочих особей и самок;

– отряд блох: крысиная блоха Xenopsylla cheopis Roth. В экспериментах используют самцов и самок 5-дневного возраста, накормленных на белых мышах за 3 часа до опыта, личинок 2-го и последнего возрастов. Этот вид наиболее значим, поскольку является переносчиком возбудителя чумы, кроме того по видовой чувствительности близок другим видам блох. При изучении репеллентной активности веществ используют голодных имаго блох 2-3-недельного возраста;

– отряд двукрылых:

комнатные мухи Musca domestica L. В экспериментах используют самок и самцов 3-5-дневного возраста, питавшихся молоком и сахарным сиропом, свежее отложенные яйца, личинок разных возрастов и куколок. Комнатные мухи являются международным тест-объектом, на котором можно тестировать различные вещества и средства, данные, полученные на мухах можно ориентировочно переносить на другие виды мух и ос. При изучении кишечного действия инсектицидов в опытах используют голодных мух, которым за 12 часов до опыта дают только воду, но не дают пищи;

комары: Желтолихорадочный комар Aedes aegypti L. – международный био-объект; Подвальные комары Culex pipiens molestus Forsk; Малярийные комары Anopheles maculipennis Meigen, An. stephensi, An. atroparous. В экспериментах используют самок 5-дневного возраста, накормленных раствором сахара в воде за 3 часа до опыта,

личинок 2, 3-го и начала 4-го возрастов и куколок, развивающихся в водопроводной дехлорированной воде. При изучении репеллентной активности веществ используют голодных имаго комаров 8-10-дневного возраста;

– отряд жесткокрылых: кожееды Attagenus smirnovi Zhant. В экспериментах используют имаго и личинок 11-12-дневного возраста. Является тестовым объектом для всех видов кожеедов;

– отряд чешуекрылых: платяная моль Tineola bisselliella Humm. В экспериментах используют бабочек и гусениц 28-30-дневного возраста. Является тестовым объектом для всех видов молей (шубной, ковровой, мебельной).

Класс паукообразные:

– отряд паразитиформные клещи (Parasitiformes):

иксодовые: клещи родов Ixodes (например, таежный Ixodes persulcatus P.Sch. и лесной I. ricinus L.), Dermacentor, Hyalomma и др. В экспериментах используют активных голодных имаго, нимф, личинок. Наиболее устойчивы к воздействию химических и биотических и абиотических факторов имаго;

аргасовые Ornithodorus papillipes (Bir.) нимфы III и IV возрастов, голодавшие не более 5-7 месяцев; самки, самцы, голодавшие не более 1 года;

гамазовые: крысиный клещ Ornythonissus bacoti (Hirst). В эксперименте используют взрослых клещей.

– отряд акариформные клещи (Acariformes):

клещи домашней пыли: Dermatophagoides pteronyssinus (Trouessart) и D. farinae (Huges). В экспериментах используют имаго, личинок;

чесоточные: ушной кроличий клещ Psoroptes cuniculi (Hering); модельный объект для чесоточного клеща человека. В эксперименте используют самок.

Группы членистоногих, при экспериментах с которыми целесообразно использовать особей из природных популяций:

– муравьи: рыжий домовый муравей Monomorium pharaonis L., черный садовый муравей Lasius niger L. и муравей Myrmica rubra L. (рабочие особи);

– вши: платяные Pediculus humanus corporis De Geer. и головные Pediculus humanus capitus вши (имаго, личинки и яйца);

– комары: различные виды родов Aedes, Culex, Anopheles (личинки, имаго);

– клещи иксодовые все виды.

Основной принцип выбора между инсектарной культурой и природной популяцией членистоногого состоит в адекватности получаемого экспериментального ответа относительно целевой эффективности средства при реальных условиях применения. При проведении натурных экспериментов перечень видов членистоногих увеличивается.

2.1.4. Принципы приготовления рабочих растворов для проведения экспериментов и расчеты активности субстанций и препаративных форм

Для проведения экспериментов необходимо в зависимости от био-объектов и характера опытов подобрать концентрации рабочих растворов. Вначале готовят серию из 4-5 концентраций с шагом разведения 10. В качестве растворителей следует использовать ацетон, этиловый спирт или воду.

На аналитических весах берут навеску субстанции или средства и готовят исходный рабочий раствор определенной концентрации ($C_{исх}$), которую можно рассчитать по нижеприведенным формулам:

а) для субстанций по формуле 1:

$$C_{исх} = \frac{A \times B}{C} \qquad (1)$$

где:

A – необходимая концентрация ДВ, % (мг/л, мг/мл);

B – необходимое количество раствора, мл;

C – концентрация ДВ в веществе, % (мг/л, мг/мл).

Пример 1: из вещества, содержащего 90% ДВ, необходимо приготовить 100 мл раствора с концентрацией ДВ 0,3%.

$C_{исх}$ = 0,3 × 100 : 90 = 0,33 мл (г), то есть к 99,67 мл растворителя необходимо добавить 0,33 мл испытуемого вещества.

Пример 2: из 50% концентрата эмульсии необходимо приготовить 0,7% водную эмульсию.

$C_{исх}$= 0,7 × 100 : 50 = 1,4 мл

б) для препаративной формы:

В том случае, если необходимо приготовить раствор заданной концентрации для обработки определенной площади так, чтобы получить заданную дозировку, производится расчет по формуле 2:

$$\mathbf{C_{исх} = \frac{D \times S}{C_{преп} \times V} \times 100\%} \qquad (2)$$

где:

$C_{преп}$ – концентрация ДВ в средстве, % (мг/л, мг/мл);

$C_{исх}$ – концентрация ДВ в исходном растворе, % (мг/л, мг/мл);

D – заданная доза, мг/м^2 (г/м^2);

S – площадь обрабатываемой поверхности, м^2 (см^2, га);

V – объем препарата для обработки этой поверхности, см^3 (мл, л).

Пример: нужно получить дозу (D) величиной 0,1 г/м^2 при обработке диска из фильтровальной бумаги площадью (S) 78 см^2 (0,0078 м^2) раствором в объеме (V) 1 мл. Концентрация ДВ в препарате ($С_{преп}$) – 5% (0,05). Все показатели используются в одной размерности – граммы и квадратные метры или килограммы (литры) и гектары. Проценты даются десятичной дробью (5% = 0,05).

Расчет:

$С_{исх} = (0,1 \times 0,0078) : (0,05 \times 1) \times 100\% = 1,56\%$

То есть, для получения исходного (рабочего) раствора нужно приготовить 1,56% раствор препарата (развести в соотношении 1:63).

Из исходного раствора готовят серию 10-кратных разведений. Для этого к 1 мл исходного раствора добавляют 9 мл растворителя и в результате получают второе разведение; к 1 мл второго разведения добавляют 9 мл растворителя и получают третье разведение и т.д. В нашем примере получаем серию растворов, 1 мл которых на фильтрах стандартного размера обеспечивает дозировки 0,1 г/м^2, 0,01 г/м^2, 0,001 г/м^2 и т.д.

Для более точного нахождения среднесмертельных концентраций (доз) готовят серии концентраций (не менее 4-5) с шагом разведения 2 или менее в зависимости от вида членистоногого, типа субстанции или средства.

Инсектоакарицидную активность оценивают по проценту гибели членистоногих в опытных вариантах по сравнению с контрольным. В качестве контрольного варианта следует использовать или необработанных членистоногих, или обработанных растворителем, используемым для приготовления рабочих растворов, или контакт членистоногих с поверхностью, обработанной растворителем.

В зависимости от организации эксперимента возможны 3 варианта оценки инсектоакарицидной активности.

Опыт, при котором членистоногое контактирует с испытуемым веществом, нанесенным на поверхность (или при топикальном нанесении вещества на тело) (опыт), и в контроле – с растворителем или необработанной поверхностью. В этом случае инсектоакарицидную активность вещества (Y) в каждой повторности оценивают по формуле 3:

$$\mathbf{Y = \frac{B_o}{A_o} \times \left(1 - \frac{B_k}{A_k}\right) \times 100\%,} \qquad (3)$$

где:

A_o и $A_к$ – исходное количество особей в опыте и в контроле;

B_o и $B_к$ – количество погибших особей в опыте и в контроле.

Заключительная оценка представляет среднюю величину из всех повторностей опыта.

Если гибель особей в контроле превышает 20%, то опыт бракуют.

Для получения более надежных оценок препарата исследование следует повторить с более жизнеспособной культурой членистоногих или изменить условия опыта в сторону большей их комфортности для объекта как в контроле, так и в опыте.

Если по каким-то причинам постановка контроля невозможна и об инсектицидной активности приходится судить только по числу (численности) особей до и после применения вещества, формулу упрощают (формула 5):

$$\mathbf{Y = \frac{1 - B_o}{A_o} \times 100\%} \qquad (5)$$

Для определения $СД_{50(95,99)}$, $СК_{50(95,99)}$ используют графический способ вычисления этих показателей, применяя

пробит-логарифмическую бумагу. На оси абсцисс откладывают дозы ДВ (г/м^2, мкг/г массы насекомого, мг/особь) или концентрации (%) в последовательных разведениях. На оси ординат – %% гибели насекомых при этих дозах (концентрациях). Между полученными точками проводят линию регрессии. Для определения $СД_{50}$($СК_{50}$) проводят горизонтальную линию на уровне 50% до пересечения с линией графика. Опущенный из точки пересечения перпендикуляр на ось абсцисс покажет по шкале на этой оси искомое значение. Проводя горизонтальную прямую на других уровнях и опуская перпендикуляр, можно определить соответствующие другие значения СД(СК), например, для определения $СД_{95}$ горизонтальную прямую до пересечения с линией графика проводят на уровне 95% и т.д.

Для определения массы одного членистоногого до опыта взвешивают не менее 10 анестезированных особей (обычно от 10 до 100 особей).

Пересчет концентрации (%) в дозу (мкг/г массы членистоногого) при использовании топикального метода нанесения проводят по формуле 6:

$$СД_{50}, \text{ мкг/г} = \frac{A \times 10 \times Y \times 1000}{B}, \qquad (6)$$

где:

A – концентрация $СК_{50}$,%;

Y – нанесенный объем, мкл;

B – масса членистоногого, мг.

Таким образом возможен перевод любой концентрации в дозу.

Пересчет величин $СД_{50(95,99)}$($ЛД_{50(95,99)}$) мкг на 1 г массы проводят по формуле 7:

$$ЛД_{50(99)} = \frac{x}{y} \times 1000, \quad (7)$$

где:

x – $ЛД_{50(95,99)}$ на 1 членистоногое в мкг;

y – средняя масса 1 членистоногого в мг.

Средняя арифметическая величина вычисляется по формуле 8:

$$X = \frac{\Sigma V}{n}, \quad (8)$$

где:

V – гибель членистоногих в каждом опыте, %;

Σ – знак суммы;

n – число повторностей.

Ошибку среднего значения инсектицидной активности средства (и других средних величин) рассчитывают по известной формуле ошибки средней:

$$m_y = \frac{\delta}{\sqrt{n}}; \qquad \delta = \sqrt{\frac{\Sigma V^2 - \frac{(\Sigma V^2)}{n}}{n-1}} \quad (9)$$

где:

V – значение инсектицидной активности в каждой из повторностей опыта, %;

n – число повторностей;

Σ – знак суммы.

Из-за малого числа повторностей ошибка средней в энтомотоксикологических исследованиях может быть очень велика, особенно в диапазоне около 50%, но при приближении средней эффективности к 100% она снижается. Так, при эффективности препарата в трех повторностях 70, 80 и 90% ошибка составит 7,1%, а при значениях эффективности 85, 90 и 95% – 3,5%.

Для оценки степени достоверности средней величины X при данном числе наблюдений используют формулу (10) для подсчета ошибки средней:

$$x = \pm \frac{P \times (100-P)}{n}, \quad (10)$$

где:

P – среднее квадратичное отклонение;

n – число наблюдений.

Значение среднего квадратичного отклонения получают по формуле:

$$X = \frac{\Sigma x^2}{n - 1} \quad (11)$$

где:

x^2 – сумма квадратов отклонения от среднего (дисперсия);

n – число наблюдений.

Коэффициент отпугивающего действия репеллентов для насекомых рассчитывают по формуле 12:

$$\mathbf{КОД} = \frac{\mathbf{A - B}}{\mathbf{A}} \times \mathbf{100\%}, \quad (12)$$

где:

A – количество насекомых на необработанной поверхности за определенный промежуток времени;

B – количество насекомых на обработанной репеллентом поверхности за такой же промежуток времени.

Коэффициент отпугивающего действия для клещей рассчитывают по той же формуле 12, где: A – количество клещей, взятых в опыт; B – количество клещей, прошедших обработанную репеллентом зону.

При испытании веществ природе, когда об их эффективности судят по уменьшению численности объекта на опытном и контрольном участках, расчет проводят по формуле 13:

$$\mathbf{Y = 100 - \frac{A_t \times B_o}{A_o \times B_t} \times 100}, \qquad (13)$$

где:

A_o – количество объектов на опытном участке до обработки;

B_o – количество объектов на контрольном участке до обработки;

A_t – количество объектов через t суток (часов) на опытном участке после обработки;

B_t – количество объектов через t суток (часов) в контроле после обработки.

Индекс скорости присасывания (ИСП) для иксодовых клещей рассчитывают по формуле 14:

$$\mathbf{ИСП} = \frac{\mathbf{V_k}}{\mathbf{V_o}}, \qquad (14)$$

где:

V_k – средняя скорость присасывания клещей в контроле, мин.;

V_o – средняя скорость присасывания клещей в опыте, мин.

При использовании метода определения активности инсектицидных карандашей, мелков, брусков для тараканов возникает необходимость рассчитать площадь 3 концентрических полос нанесенных на оберточную бумагу.

Площадь каждой полосы рассчитывают по формуле 15:

$$S = \frac{3{,}14 \times R^2}{2} \text{ см}^2 \qquad (15)$$

При испытании инсектицидной активности средств в аэрозольной упаковке рассчитывают концентрацию (С) инсектицида в воздухе по формуле 16:

$$C = \frac{Q \times Z}{V}, \qquad (16)$$

где:

Q – количество смеси, выпущенной из аэрозольного баллона в камеру, определяемое по разности веса упаковки до и после опыта, г;

Z – доля инсектицида в смеси, % действующего вещества, пересчитанного в мг/г, определяемая составом наполнителя;

V – объем камеры, $м^3$.

Рассчитывают показатели $C_{15}(мг/м^3)$ – концентрация, которая вызывает поражение 99% мух или комаров в течение условно принятого времени – 15 мин. (формула 17) и Q_{15}, мг/м3 – количество смеси, выпущенное из баллона, вызывающее поражение 99% насекомых за 15 мин. (формула 18).

$$C_{15} = \frac{C \times T}{15} \qquad (17) \qquad Q_{15} = \frac{C_{15} \times 100}{масс\ \%\ ДВ} \qquad (18)$$

Коэффициент защитного действия ($КЗД_{комары}$) средств от комаров рассчитывают по формуле 19:

$$\mathbf{КЗД_{комары}\ (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100}, \qquad (19)$$

где:

А – число укусов комаров через ткань контрольного теста за период испытаний;

В – число укусов комаров через ткань опытного теста за период испытаний.

Коэффициент отпугивающего действия ($КОД_{мухи}$) препаратов в камере рассчитывают по формуле 20:

$$КОД = \frac{К - О}{N} \times 100, \qquad (20)$$

где:

О – количество насекомых в опытной камере;

К – количество насекомых в контрольном (холостом) варианте;

N – количество насекомых всего в опыте.

Коэффициент аттрактивного действия ($КАД_{мухи}$) препаратов рассчитывают по формуле 21:

$$КАД = \frac{О - К}{N} \times 100, \qquad (21)$$

где:

О – количество насекомых в опытной камере;

К – количество насекомых в контрольном (холостом) варианте;

N – количество насекомых всего в опыте.

Время поражения 50% особей насекомых ($КТ_{50}$, мин.) рассчитывают по формуле 22:

$$КТ_{50} = [(КТ_{99} - КТ_1) : 2] + КТ_1 \qquad (22)$$

Индекс питания тараканов отравленными приманками (ИП) рассчитывают по формуле 22:

$$ИП = \frac{А - Б}{А + Б}, \qquad (23)$$

где:

А – поглощение отравленной приманки, мг;

Б – поглощение альтернативного корма, мг.

Расчет продолжительности действия антимольного средства при обработке ткани или меха рассчитывают согласно «Временной инструкции И-42-2-82 по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода ускоренного старения» по формулам 24, 25 и 26:

$$С = К \times Сэ, \qquad (24)$$

где:

С – срок годности;

$С_э$ – экспериментальный срок годности;

К – коэффициент соответствия.

$K = A^x$, (25)

$x = (Т_э-Т_{хр})/10$, (26)

где:

А – температурный коэффициент скорости химической реакции;

$Т_э$ - повышенная температура, равная 40°С;

$Т_{хр}$ – температура хранения, равная 20°С.

Приведенная зависимость основана на правиле Вант-Гоффа о 2-4 кратном росте скоростей химических реакций при увеличении температуры на 10°С. Поскольку в данной инструкции температурный коэффициент скорости химической реакции А принят равным 2, тогда в нашем случае x = 2, K = 2x2 = 4. Таким образом, при сохранении инсектицидности в течение 1 месяца хранения образцов в термостате при 40°С, срок сохранения инсектицидности при 20°С равен 1 мес. × 4 = 4 мес., 2 мес. × 4 = 8 мес., 3 мес. × 4 = 12 мес.

2.2. Методы определения активности действующих веществ (субстанций) дезинсекционных средств

2.2.1. Общие методы определения инсектоакарицидных свойств действующих веществ (субстанций)

Метод топикального нанесения инсектоакарицидов на членистоногих Растворы инсектоакарицидов (спиртовые или ацетоновые) определенного объема с помощью микродозатора наносят на среднеспинку мух, среднегрудь клопов и тараканов или на спинной щиток иксодовых или аргасовых клещей, В качестве микродозатора

можно использовать микрошприцы, специальные аппликаторы или петли из некорродирующей проволоки. Размер капли должен быть сопоставим с размером членистоногого, но не должен его превышать. Рекомендуются следующие размеры капель: для мух, тараканов и клопов – 1 мкл, для постельных клопов – 0,5 мкл; для иксодоидных клещей – 0,3 мкл. В опыте используют не менее 5-7 концентраций инсектицидов. Параллельно ставят 2 контрольных варианта, в первом на членистоногих наносят растворитель без инсектоакарицида, во втором - членистоногих оставляют без обработки. Все опыты ставят в 3 повторностях, в каждой по 10-20 особей. В период проведения опытов температура воздуха в помещении должна составлять 21-23°С, относительная влажность – 55-60%.

Членистоногих после нанесения инсектоакарицида (растворителя) и его высыхания помещают в чистые сосуды: клопов и аргасовых клещей – в пробирки с фильтровальной бумагой, сложенной «гармошкой»; иксодовых клещей – в пробирки с дифференцированной влажностью; мух и тараканов – в стаканы. Тараканам дают пищу. Сосуды с членистоногими размещают в условиях постоянной температуры (22±2°С) и освещенности или при комнатной температуре и естественной освещенности. Учет результатов опытов для комнатных мух проводят через 24 часа; клопов, тараканов, клещей – ежедневно, в течение 1-5 суток в зависимости от химической принадлежности инсектоакарицида. К живым относят особей, способных к направленному передвижению, а особей, неподвижных или с резкими нарушениями координации – к мертвым. Если смертность членистоногих в контрольном варианте составляет более 5%, то в расчеты гибели необходимо вводить поправку по формуле Аббота (формула 4).

При проведении экспериментов используют не менее 5 концентраций, которые должны вызывать гибель в интервале 0,1-99,9%. Полученные результаты обрабатывают с помощью пробит-анализа, строя кривую регрессии «концентрация-гибель» или «доза-гибель». По кривой регрессии рассчитывают показатели $СК_{50}$,% ($ЛД_{50}$,мкг/г), $СК_{95}$,% ($ЛД_{95}$,мкг/г), $СК_{99}$,% ($ЛД_{99}$,мкг/г).

При указании данных по летальным концентрациям или дозам необходимо указывать вид членистоногого, при необходимости пол, стадию развития, происхождение расы или популяции, температуру при проведении экспериментов. Наличие таких сведений позволяет сравнивать данные разных экспериментаторов.

Если перед началом исследований неизвестен диапазон концентраций, вызывающих такую гибель, то целесообразно поставить ориентировочный опыт с интервалом разведений концентраций в 10 раз.

Точно дозированное количество растворов инсектоакарицидов, как указывалось выше, также может быть нанесено на членистоногих с помощью петли из проволоки.

Подготовка петли.

Петля должна быть изготовлена из некорродирующего материала (платина, родий, держатель спирали в электролампе) путем наматывания на иглу одного завитка. Форма петли должна быть круглой. Затем в месте соединения петли и стержня делают изгиб под прямым углом, и стержень петли прикрепляют к держателю (микробиологический держатель, цанговый карандаш и др.).

Калибровка петли.

Петлю калибруют путем перенесения 0,5 мл спирта из маленького стаканчика объемом 1 мл на фильтровальную бумагу с подсчетом

количества перенесенных капель. Опыт повторяют не менее 3 раз. Оптимальным является объем петли 1 мкл (0,5 мл = 500 капель).

Метод опрыскивания насекомых и тест-поверхностей с помощью опрыскивателей различного типа (пульверизаторы, беспропеллентные упаковки, квазары).

Членистоногих и тест-поверхности помещают на фильтровальную бумагу и опрыскивают рабочими растворами, подбирая необходимый объем жидкости в зависимости от объекта и тест-поверхности. При необходимости членистоногих предварительно анестезируют. После высыхания жидкости членистоногих переносят в чистые пластиковые или стеклянные стаканы.

Метод опрыскивания насекомых и тест-поверхностей с помощью опрыскивателя с вращающимся столиком (опрыскиватель Поттера).

Опрыскиватель состоит из следующих основных частей: распылитель жидкости, вращающийся столик для размещения биологических объектов, колпак, воздуходувка с мотором для подачи сжатого воздуха. Собственно распылитель изготавливают из латуни, нержавеющей стали или бронзы. Распылитель вставляют в отверстие колпака, воздушный шланг, идущий от воздуходувки, соединяют с распылителем. Колпак обычно делают из стекла или нержавеющей стали с окошком для наблюдения за ходом опрыскивания, высота его 40-45 см. Столик опрыскивателя делают вращающимся со скоростью 30-40 об./мин. для обеспечения равномерного покрытия поверхности каплями инсектицида. Столик снабжают тарелкой с отверстием посередине и бортиками. На столик опрыскивателя помещают чашки с обездвиженными диэтиловым эфиром насекомыми (или раскладывают их на круг фильтровальной бумаги), ставят колпак. Устанавливают на колпак распылитель, в патрубок распылителя заливают отмеренное

количество рабочего раствора определенной концентрации инсектицида (например 2,5 мл), включают мотор столика и воздуходувку. Жидкость вытекает через центральную трубку и разбивается конической струей воздуха, проходящей через щели между центральной трубкой и наконечником. Мелкие капли оседают на столик, стенки колпака и опрыскиваемые предметы. Растворы могут быть водными, спиртово-водными или приготовленными на 60% ацетоне, поскольку растворы на чистом спирте или ацетоне слишком сильно испаряются. Количество жидкости, заливаемой в опрыскиватель, подбирается экспериментально, путем сравнения результатов, полученных методом опрыскивания с результатами, полученными методом топикального нанесения инсектицида откалиброванной петлей или микрошприцем (микродозатором).

Методы принудительного контакта членистоногих с поверхностями, обработанными инсектоакарицидами. Членистоногих подсаживают на поверхности, используя два типа экспозиметров или без их применения.

В первом случае используют:

– стеклянные экспозиметры Набокова-Ларюхина высотой 13-15 см, диаметром 3,5-4,0 см;

– стеклянные экспозиметры высотой 8-10 см, диаметром 8-9 см по методу CSMA (Chemical Specialities Manufacturers Association), который применяется в международной практике для тестирования инсектицидных средств.

Время контакта в экспозиметрах Набокова-Ларюхина – 5-15 мин, в больших экспозиметрах CSMA – 1 час и более.

Экспозиметры приспосабливают для работы с разными насекомыми. Так, для экспериментов с тараканами экспозиметры

смазывают вазелином; для мух – используют специальный стеклянный поршень, прижимающий насекомых к поверхности; для блох – экспозиметр накрывают влажной многослойной марлевой салфеткой. Время контакта тараканов и постельных клопов – 15 мин., крысиных блох и комнатных мух – 5 мин. Насекомых после контакта с обработанными пластинами переносят в чистые пластиковые или стеклянные стаканы и регистрируют их состояние (без внешних признаков паралича, парализованные, мертвые) в течение 24-48 часов.

Контактирование имаго комаров можно проводить также в пластмассовых экспозиметрах-конусах, рекомендованных ВОЗ для биотестов с обработанными инсектицидами поверхностями. Внутренний диаметр конуса – 85 мм у основания, высота – 55 мм. Конусы сделаны из прозрачного гладкого пластика. В отверстие в центре конуса запускают самок комаров с помощью стандартного аспиратора с загнутым концом (диаметром 10 мм). Комары остаются в экспозиметре (то есть принудительно контактируют с обработанной поверхностью) в течение 30 мин. После этого комаров переносят в чистые садки.

Для обработки поверхностей пластин, не впитывающих жидкость (стекло), используют 50 мл/м^2 рабочей жидкости; для обработки поверхностей, впитывающих жидкость (фанера) – 100 мл/м^2.

Комнатные мухи.

Принудительный контакт комнатных мух с действующими веществами инсектицидов осуществляют в биологических пробирках. Пробирки обрабатывают ацетоновыми растворами ДВ инсектицидов в логарифмически снижающихся концентрациях (не менее 5 концентраций) из расчета 1 мл/дм^2, высушивают в потоке теплого воздуха при непрерывном вращении в горизонтальном положении.

Время контакта мух составляет 15, 30, 60 мин., после чего их высаживают в пластиковые контейнеры объемом около 250 мл (пластиковые бутылки со срезанным и затянутым марлей дном). Насекомым дают ватные тампоны, смоченные водой. Поражение мух учитывают каждый час после экспозиции до 6 часов и через 24 и 48 часов подсчитывают число погибших насекомых. Повторность опыта 3-5 кратная по 10 особей в каждом варианте.

Блохи.

Определение токсичности ДВ инсектицидов для крысиных блох Xenopsylla cheopis (Roths.) проводят с использованием непитавшихся блох 1-3-недельного возраста без разделения по полу, путем подсадки на импрегнированную инсектицидом фильтровальную бумагу.

Приготовление импрегнированной бумаги ведут непосредственно перед проведением опытов путем пропитки стандартных обеззоленных фильтров (синяя лента) ацетоновыми растворами инсектицидов в логарифмически снижающихся концентрациях. Расход жидкости составляет 1 мл/100 $см^2$. После высыхания бумагу разрезают ножницами на прямоугольники размером 5×1 см. Импрегнированную бумагу используют в течение 3 суток, но не ранее, чем через 1 час после высыхания растворителя.

Взрослых блох лабораторной культуры помещают в пробирки по 20 шт., затем опускают в них кусочки импрегнированной бумаги. Через 1 час бумагу аккуратно извлекают, а пробирки с блохами помещают в темный термостат при температуре 26ºС и относительной влажности >50%. Учет смертности проводят через 24 часа после окончания экспозиции. Лежащих блох, неспособных самостоятельно перевернуться, относят к погибшим и определяют показатели $СК_{50}$,% ($СК_{95}$,%). С каждой концентрацией инсектицида проводят 3 опыта

не менее, чем в 3 повторностях, используя не менее 20 насекомых на одну повторность. Для каждого опыта ставят три контрольных варианта (1 – необработанная бумага, 2 – обработанная ацетоном бумага, 3 – блохи в пробирках без бумаги), в каждом из которых используют не менее 20 насекомых. Из контрольных вариантов также, как из опытных бумагу извлекают через 1 час.

Иксодовые клещи.

Контактирование иксодовых клещей с обработанными поверхностями проводят, используя фильтровальную бумагу. Бумагу в виде круга диаметром 10 см (площадь – 78 $см^2$) размещают горизонтально на невпитывающей поверхности (стекло, глазурованная керамическая плитка и т. д.) и с помощью пипетки равномерно наносят на нее раствор изучаемого вещества в ацетоне (серия концентраций не менее 5) из расчета 1 мл раствора на 100 $см^2$ или 0,78 мл на круг. В контрольном варианте на круги такой же бумаги наносят тем же способом растворитель. После испарения растворителя круги помещают на дно чашек Петри так, чтобы края круга поднимались на стенки чашки. Продолжительность контакта клещей с бумагой 1 мин. Клещей, выползающих за пределы круга, кисточкой возвращают на бумагу. Поскольку клещи достаточно подвижны, одновременно в чашку Петри целесообразно помещать не более 2-3 клещей. В опыте с каждой концентрацией вещества используют по 30 клещей. Опыты с самками и самцами клещей ставят и учитывают раздельно, поскольку есть данные о разной чувствительности к акарицидам особей разного пола. Сразу после контакта клещей кисточкой переносят в пробирки дифференцированной влажности (по 10 особей в пробирке), которые размещают горизонтально в условиях постоянной температуры (около 25°С) и освещенности или при комнатной температуре и

естественной освещенности. Все работы с контрольными клещами должны быть проведены на отдельном столе с использованием незагрязненных инструментов (ножниц, кисточек и т.д.). Работы с разными концентрациями необходимо начинать с меньших. Учет гибели иксодовых клещей проводят через сутки после опыта. К живым относят особей способных к передвижению, а неподвижных, почти неподвижных и клещей с резкими нарушениями координации относят к категории мертвых. Если смертность клещей в контроле составляет более 5%, то в дальнейшие расчеты необходимо вводить поправку по формуле Аббота (формула 4). Полученные данные обрабатывают с помощью метода пробит-анализа.

Метод свободного контакта членистоногих с поверхностями, обработанными инсектоакарицидами. Этот метод позволяет более полно оценить инсектоакарицидное средство с учетом степени его потенциальной репеллентности.

Тараканы. Опыты с тараканами проводят в специальных полигонах площадью не менее 0,2 $м^2$ 40×50 см и высотой бортов 12-20 см, края которых смазаны вазелином. В центре полигона помещают пластинку (стекло, фанера) размером 10×10 см, верхняя сторона которой обработана инсектицидом в определенной выбранной дозе, обеспечивающей 50, 95 или 99% гибели тараканов в опыте с принудительным контактом. По углам этой пластинки располагают прокладки высотой 15 мм и сверху накрывают чистыми фанерными пластинками того же размера. Таким образом, получается укрытие для тараканов.

В каждый полигон помещают 120 тараканов при соотношении самок, самцов и личинок II-IV возраста – 1:1:4. В полигоне расставляют сосуды с водой и кормом (белый хлеб). Опыты ставят не менее чем

в 3 повторностях. Учет погибших насекомых проводят каждые 24 часа в течение 3-5 суток или более в зависимости от целей эксперимента и изучаемого средства.

Муравьи.

Опыты с рабочими особями муравьев проводят в полигонах площадью не менее 0,2 $м^2$ с высотой бортов 12-20 см, края которых смазаны слоем вазелина шириной не менее 2 см. В центре полигона помещают пластину (стекло, фанера) размером 10×10 см, верхняя сторона которой обработана инсектицидом.

В каждый полигон помещают лист бумаги в виде неплотно свернутой трубочки (убежище для муравьев), ставят поилку с ватой, пропитанной водой, и корм (в том числе, белый хлеб, вареное яйцо, вареное мясо, рыбу). Затем в каждый полигон запускают 50-100 рабочих особей муравьев. Опыты ставят не менее чем в 3 повторностях. Учет погибших насекомых проводят каждые 24 часа в течение 2 суток.

Мухи.

Опыты на мухах проводят в стеклянных камерах объемом 1 $м^3$, имеющих затянутые марлей «окна» для проветривания. В каждую камеру помещают по 300 особей мух обоего пола в соотношении 1:1 и сосуд с 10% сахарным сиропом. Камеру снаружи освещают электролампой (60 Вт). Ленты или пластинки, пропитанные инсектицидом, в разных дозах, обеспечивающих 50, 95 и 99% гибели мух в опытах с принудительным контактированием, подвешивают в верхней части камеры. Каждый вариант опыта и контроль ставят не менее, чем в 3 повторностях. Учет погибших насекомых проводят через 24 часа. Эффективность препарата в каждом варианте опыта оценивается по формуле 3.

Метод изучение раздражимости комаров под действием инсектицидов. Раздражимость комаров может быть вызвана не только самим инсектицидом, но и другими компонентами, входящими в состав испытываемой формы. Раздражимость крайне важна при работе с эпидемиологически опасными малярийными комарами, поскольку способствует перелету комаров из обработанных помещений (хлева, надворные постройки) в необработанные (жилые помещения). Риск заражения малярией при этом многократно увеличивается.

Фильтровальную бумагу обрабатывают из опрыскивателя с мелкодисперсной головкой рабочим раствором инсектицида в концентрации, отобранной в первичном опыте. Исследования проводят через 1-2 суток после обработки.

Аппарат для определения раздражимости представляет собой светонепроницаемую камеру из легкого дерева размером 135×135×90 мм. Свет проникает в неё сквозь круглое отверстие в задней стенке диаметром 90 мм, по бокам которого имеются пазы для матового стекла, пропитанной инсектицидом бумаги (или контрольной) и конического экспозиметра (те же конусы, что и для определения продолжительности действия инсектицида). Опыты проводят в темной комнате с единственной электрической лампочкой, помещаемой перед задней стенкой прибора на расстоянии, зависящем от мощности лампы: 40 Вт – 41 см, 60 Вт – 55 см, 100 Вт – 92 см. Комаров в садке перед опытом содержат в той же комнате при том же освещении (то есть расстоянии от лампы) в течение 0,5-1 часа. Каждого комара (сытых самок) сначала сажают в контрольный экспозиметр (та же бумага, но без инсектицида), где выдерживают 3 мин., а затем в течение 10 мин. подсчитывают число взлетов. Комары, взлетевшие в контроле 2 и более раз, выбраковываются как спонтанно раздражимые. Обычно таких мало.

Причиной спонтанной раздражимости могут быть травмы комаров при пересадке или неблагоприятные условия (при массовой раздражимости). Спокойных комаров (не было взлётов или 1 случайный взлёт без ползания по бумаге) по одному пересаживают в опытный экспозиметр с бумагой, обработанной инсектицидом, и после 3 мин. начинают подсчет взлетов, продолжающийся 10 мин. Отмечают также «хождение» комара по бумаге, что тоже говорит о раздражимости. В опыте должно быть использовано не менее 50 особей. По окончании опыта подсчитывают распределение особей по степени раздражимости. Для подвальных комаров Cx. pipiens опыты по раздражимости также важны, поскольку при некачественной обработке (с огрехами) комары, обладающие раздражимостью, выбирают для посадок необработанные инсектицидом места.

2.2.2. Методы изучения фумигационного действия инсектицидов

Метод изучения фумигационной активности летучих соединений Опыты проводят в сосудах емкостью 1 л. На стенках сосудов внутри помещают фильтровальную бумагу 10×20 см, предварительно пропитанную 2 мл ацетонового (спиртового) раствора препарата и просушенную при комнатной температуре не менее 20 мин. При использовании сосудов большего объема размер бумаги соответственно увеличивают. Расчет ДВ проводят в г/м^3 по ДВ. К крышке сосудов подвешивают садок из металлической сетки на расстоянии 10 см от дна. В садок помещают комнатных мух, тараканов или постельных клопов (не менее 10 насекомых). В опытах используют серии концентраций в 3 повторностях. Подсчет погибших насекомых осуществляют через 3-6-24 часа. Расчет эффективности проводят по формуле 5. Определяют концентрации, которые обеспечивает 50, 95 и 99% гибели насекомых.

Метод изучения фумигационной активности летучих соединений для комнатных мух. Фильтровальную бумагу пропитывают ацетоновыми растворами инсектицидов при норме расхода 1 мл/дм^2. Используют несколько концентраций с шагом 2-5. Бумагу помещают в среднюю часть стеклянных сосудов объемом 10 л. Для сравнения фумигационной способности и инсектицидности разных ДВ площадь испытуемых образцов должна быть одинаковой. В сосуды помещают поилки для насекомых (небольшой пластмассовый контейнер с влажной ватой). Комнатных мух (имаго 3-6-дневного возраста, без разделения по полу по 100-150 шт.) выпускают в сосуды, закрывают их бязью, и фиксируют время наступления паралича с интервалом 5-15 мин. в течение 1 часа и далее каждые 30 мин. в течение 6-7 часов. После поражения 95% насекомых в опыте бумагу извлекают из сосуда и через 24 часа учитывают долю оставшихся в живых особей. Оценку фумигационной активности инсектицидов проводят путем сравнения показателей – КТ50 и КТ95 – времени (минут или часов), за которое 50% (95%) насекомых в эксперименте находятся в состоянии нокдауна и показателя характеризующего обратимость состояния паралича – доли оставшихся в живых особей при учете через 24 часа. Повторность опытов трехкратная. Опыты проводят при постоянной температуре воздуха 23-25°С. $КТ_{50}$,мин. рассчитывают по формуле 22, или определяют графическим способом.

2.2.3. Методы изучения кишечного действия инсектицидов

Метод группового кормления мух жидкими приманками.

Раствором инсектицида в 10% сахарном сиропе (50 мл) пропитывают кусочки ваты массой 1 г, которые размещают тонким слоем на дне чашек Петри. При изучении веществ, нерастворимых в

воде, готовят 10% спиртовой раствор, а затем разбавляют его сахарным сиропом до нужной концентрации. Испытания инсектицидов проводят в концентрациях 0,001; 0,01; 0,1; 1,0%, в каждой не менее 3 повторностей. В марлевый садок размером (20 × 20 × 20) см помещают чашку Петри с испытуемым веществом (отравленной приманкой), в качестве альтернативной пищи ставят сосуд с молоком.

Метод группового кормления мух сухими сахарными приманками.

В опытах используют голодных комнатных мух без разделения по полу 3-4-дневного возраста чувствительной лабораторной культуры. В течение первых 3 суток после начала вылета мухам в качестве корма дают только сахар и воду. За 16 часов до начала эксперимента у мух отнимают корм, оставляя в садках только воду. Приготавливают ацетоновые растворы ДВ инсектицида, которыми обрабатывают сахарный песок из расчета 1 часть ацетонового раствора на 2 части сахарного песка. Сахарный песок развешивают по 2 г на часовые стекла или стеклянные чашки Петри, затем наливают пипеткой 1 мл ацетонового раствора инсектицида и оставляют под тягой до полного испарения растворителя. Для получения необходимой дозы инсектицида в сахаре готовят исходный ацетоновый раствор инсектицида, учитывая, что при нанесении 1 мл 1% раствора, то есть 10 мг ДВ инсектицида в 1 мл ацетона на 2 г сахара, доза инсектицида в приманке составляет 5 мг/г сахара.

В качестве емкостей для содержания мух можно использовать либо марлевые садки размером 30×30×30 см, либо прозрачные пластиковые емкости (бутылки) объемом 2 л. В последнем случае у бутылок срезают дно и закрывают его марлевыми салфетками. Салфетки закрепляют резиновыми колечками. Бутылку кладут горизонтально, в горлышко помещают ватный тампон, смоченный

водой, в середину бутылки помещают сахарную приманку на подложке (маленькие чашки Петри и т.п.).

Для вычленения кишечного действия инсектицида опыты следует проводить в двух вариантах: первый – открытая приманка в чашке Петри, и второй – приманка в мелкоячеистой сетке, для предотвращения контакта лапок мух с отравленным сахаром. В этой модификации группового кормления удобно использовать быстрорастворимый рафинад, который пропитывают ацетоновыми растворами ДВ инсектицидов, учитывая массу каждого кубика. Кубики помещают в чашки Петри диаметром 4 см и вкладывают в сетчатый конверт из фатина (мелкоячеистая сетка), который плотно натягивают и закрепляют. Данные, полученные в результате экспериментов с открытыми и засетченными кубиками, сравнивают по показателям $СД_{50}$ и $СД_{95}$.

В опыте используют предварительно анестезированных эфиром или охлажденных в холодильнике мух. В контрольном варианте используют сахарный песок, обработанный ацетоном без инсектицида в том же объеме, что и в опытном варианте. Проводят 3 опыта не менее, чем в 3 повторностях, используя не менее 120 насекомых на одну концентрацию (40 мух на одну пластиковую бутылку), в контрольном варианте используют не менее 40 насекомых.

Опыты проводят при постоянной температуре воздуха (оптимальной является 23±2°С) и относительной влажности более 50%. Учет гибели насекомых проводят через 24 и 48 часов. Мух, лежащих на спине, неспособных самостоятельно перевернуться и ползать, относят к погибшим.

При изучении активности готовой сухой сахарной приманки (40-60% сахара) ее наносят на пластинки из стекла или фанеры, которые

помещают в садок. В опытах используют 30 мух обоего пола 3-5-дневного возраста. За 12 часов до опыта в садках, в которых выращивают мух, оставляют только воду. Контролем служат мухи, питавшиеся молоком. Подсчет погибших мух проводят через 3, 24 и 48 часов. Эффективность инсектицида определяют по числу мух, погибших в опытных и контрольных садках (формула 3). Определяют концентрации, которые обеспечивают 50, 95 или 99% гибели мух.

Метод группового кормления тараканов. Опыты с групповым кормлением тараканов можно проводить в полигонах площадью 0,2 $м^2$ 40×50 см и высотой бортов 15 см. По периметру борта смазывают вазелином для предотвращения ухода насекомых. В полигон помещают укрытие из картона, поилку с водой, приманку и, при необходимости, альтернативный корм. В качестве основы для приготовления приманки можно использовать сухой собачий корм или экструдированный комбикорм для лабораторных животных (грызунов). В этом случае гранулы корма размалывают на кофемолке, развешивают полученный порошок в стеклянные бюксы по 2 г, добавляют сырой желток куриного яйца по 1 г, ацетоновые растворы инсектицидов в логарифмически снижающихся концентрациях по 0,5 мл. Полученную массу тщательно перемешивают и развешивают на маленькие чашки Петри диаметром 4 см по 1 г. Массу каждой приманки записывают и чашки ставят сушить при комнатной температуре до полного высыхания (приобретения постоянной массы) (около 7 суток). Альтернативный корм готовят аналогично контрольному варианту, добавляя вместо инсектицида такой же объем растворителя (ацетон).

В каждый полигон помещают не менее 20 экземпляров самок (без оотек) или самцов рыжих тараканов, предварительно голодавших не менее 2 суток. Учет пораженных и погибших насекомых и поедаемость

приманок путем взвешивания их на аналитических весах, определяют ежедневно в течение 7-15 суток. Для выявления аверсии (индекса питания) в вариантах с альтернативным кормом проводят расчет величины индекса питания (ИП) по формуле 23.

Метод дозированного кормления насекомых.

Метод предусматривает кормление насекомых из микропипетки с оттянутым концом водными растворами (эмульсиями), приготовленными на 10% сахарном сиропе. Метод позволяет точно регулировать количество раствора, выпиваемого насекомыми, путем прерывания кормления в нужный момент. При постоянном объеме раствора (для комнатных мух – 0,01 мл, рыжих тараканов – 0,05 мл) дозу инсектицида варьируют путем изменения концентрации ДВ. Перед кормлением мух выдерживают без питания 12 часов, тараканов – 2 суток. В контрольных опытах насекомых кормят сахарным сиропом или растворителем. Опыты ставят в 3 повторностях для каждой концентрации, в каждой повторности используют не менее 10 насекомых. За процессом отмирания комнатных мух наблюдают в течение 1 суток, тараканов – в течение 3-5 суток. Критерием оценки эффективности инсектицида служит величина $ЛД_{50(99)}$ выраженная в мкг на одно насекомое или в мкг на 1 г массы насекомого (формулы 6, 7).

2.2.4. Метод изучения проявления нокдаун-эффекта у насекомых под действием инсектицидов

Сравнительную оценку проявления нокдауна проводят экспресс-методом. Метод основан на измерении времени, проходящего от обработки насекомых до наступления состояния нокдауна ($КТ_{100}$, мин. – среднее по повторностям для 100% особей, $КТ_{50}$ – среднее по повторностям для первых 50% особей). На необездвиженных

тараканов или 5-6 дневных имаго комнатных мух наносят по 1 мкл ацетоновых растворов инсектицидов. Затем насекомых помещают в чистые стеклянные емкости с вертикальными стенками (стаканы или пробирки).

Нокдаун считают зафиксированным, когда насекомое не может удержаться на вертикальной стенке сосуда. В опыте применяют 3-5 концентраций инсектицидов, различающихся в 2-10 раз. Повторность опыта 3-5 кратная, на каждую повторность используют 10 насекомых. Учет времени наступления состояния нокдауна ведут индивидуально, рассаживая насекомых по одной особи в пробирку. При работе с тараканами время наступления состояния нокдауна определяют отдельно у самцов и самок. Показателем наступления состояния нокдауна у насекомых служит неспособность их ползти вверх по поверхности стекла, переворачивание на спину и нарушение координации движения. Отмечают время в минутах от нанесения инсектицида до проявления первых признаков отравления (гиперактивность, нарушение координации движений) и наступления состояния нокдауна (глубокий паралич). Учитывают динамику отравления обработанных насекомых (% пораженных насекомых) в течение 24-96 часов в зависимости от вида. Для характеристики состояния нокдауна (обратимый, необратимый) строят график. Построение графика ведут в полулогарифмических координатах, на оси абсцисс откладывают время наступления нокдауна (логарифмическая шкала), по оси ординат % пораженных насекомых. В том случае, если состояние нокдауна является обратимым, % пораженных насекомых уменьшается во времени. Если состояние нокдауна является необратимым – насекомые полностью погибают.

2.2.5. Методы изучения акарицидной активности действующих веществ

Оценка биологической активности акарицидов может быть проведена на активных нетравмированных самках различных видов иксодовых клещей. Предпочтительнее использовать для опытов виды, имеющие наибольшее распространение и эпидемиологическое значение. Например, для Российской Федерации самыми эпидемиологически значимыми видами являются таёжный (I. persulcatus) и лесной (I. ricinus) клещи, являющиеся основными переносчиками возбудителей клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза. Желательны, но не обязательны, дополнительные испытания в отношении самцов клещей и видов, являющихся второстепенными переносчиками. При необходимости исследования проводятся на нескольких видах клещей, отличающихся биологией, географическим распространением и чувствительностью к акарицидам. Предпочтительнее испытания проводить в период высокой активности клещей в природе и использовать самок природной популяции. Собирать самок с растительности следует не более чем за сутки до проведения опытов и хранить их в пробирках дифференцированной влажности или во влажных бинтах при температуре 12±2ºС. Возможно использование самок лабораторного разведения после проверки их двигательной активности и агрессивности.

Метод определения скорости наступления состояния нокдауна и высоты подъема клещей по обработанной ткани.

Данный метод целесообразно использовать для оценки активности акарицидов, проявляющейся в первые 15 мин. воздействия. Такие данные необходимы для решения вопроса о перспективности вещества

как активной субстанции в средствах индивидуальной защиты людей от нападения иксодовых клещей.

В опытах используют тест из хлопчатобумажной бязи, представляющий собой ленту 10×70 см, на которую на расстоянии 10 см от края (далее отметка 0) наносятся карандашом отметки длины вплоть до 60 см. Тесты размещают горизонтально на невпитывающей поверхности (стекло, керамическая плитка и т. д.). На опытный тест из пипетки равномерно на участок ленты, начиная от отметки 0 до 10 (площадь обрабатываемого участка 100 $см^2$) наносят 1 мл 1% ацетонового раствора изучаемого вещества. Контрольный тест обрабатывают аналогично, используя ацетон. После испарения растворителя все тесты развешивают в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности, освещенности.

Опыты проводят в день обработки. Рабочий стол должен быть освобожден от лишних предметов и застелен белой бумагой, что уменьшит вероятность потери клеща. Тесты закрепляют под углом 70° к горизонту. Клещей по одному помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от гипостома. Время регистрируют с помощью секундомера. На контрольном тесте самки таёжного клеща при температуре 22±2°С должны за две минуты проходить путь не менее 25-30 см. На опытном тесте регистрируют время от момента пересечения клещом нижней черты обработанного участка до отпадения клеща с теста, что соответствует времени наступления состояния нокдауна (КТ, мин.). Часто полезным является выполнение рисунков, отражающих перемещение клещей по тестам. Отпавших клещей помещают в 70% раствор этилового спирта с целью их

консервации или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Опыт проводят не менее чем с 30 самками. Рассчитывают среднее значение времени наступления состояния нокдауна $КТ_{ср}$, в минутах и статистическую ошибку. Одновременно с определением $КТ_{ср}$ регистрируют максимальную высоту подъема клеща по тесту. Рассчитывают среднее значение этого показателя в сантиметрах $МВ_{ср}$ и статистическую ошибку. Целесообразно сопоставить полученные данные по акарицидной активности веществ с приведенными в выполненных ранее аналогичных работах.

Метод определения скорости присасывания клещей.

Данный метод позволяет оценить изменение агрессивности иксодовых клещей по отношению к теплокровному животному, обусловленное воздействием акарицида. Известно, что многие акарициды обладают свойством ускорять присасывание клещей к теплокровным организмам.

На тщательно выстриженную спину лабораторного кролика коллодием или другим не токсичным для кожи клеем приклеивают рядом 4 стеклянных цилиндра (диаметр 3, высота 4 см). Один цилиндр является контрольным, а три – опытными. Сначала в контрольный цилиндр запускают 5 самок, ползавших до этого в течение 2 мин. на необработанном (контрольном) тесте. Верхнее отверстие цилиндра затягивают мелкосетчатым материалом, закрепляя его резиновым кольцом. Время от запуска до присасывания каждой самки к кролику регистрируют с помощью секундомера.

В каждый из опытных цилиндров запускают по 5 самок сразу после их контакта с обработанной поверхностью теста. Время контакта должно равняться ½ $КТ_{ср}$. Контроль и опыт повторяют трижды. Рассчитывают среднее значение времени присасывания самок в

контроле, опыте и отношение этих показателей, которое называется индексом скорости присасывания (ИСП) по формуле 14. Целесообразно сопоставить полученные данные с приведенными в выполненных ранее работах.

2.2.6. Методы изучения репеллентной активности веществ по отношению к кровососущим насекомым и клещам

Изучение веществ, обладающих репеллентной активностью в отношении членистоногих, проводят в два этапа. На первом этапе определяют уровень репеллентной активности 5, 10 и 20% растворов вещества в этиловом спирте в отношении стандартных лабораторных культур комаров Ae. aegypti и блох X. cheopis. Исследования проводят в сравнении с эталоном, в качестве которого рекомендуется широкоизвестный репеллент диэтилтолуамид (ДЭТА) в аналогичных концентрациях. На втором этапе изучают спектр репеллентного действия отобранных веществ в разных концентрациях по отношению к природным популяциям различных видов насекомых и клещей. Поскольку токсичность отбираемых веществ, как правило, не изучена в полном объеме, для опытов используют специальные ольфактометры. Преимущество рекомендуемых ольфактометров состоит в том, что можно одновременно испытывать несколько веществ с неизвестной токсичностью, эталон и контроль. Репеллентную активность токсикологически изученных репеллентных веществ после соответствующего заключения о безопасности нанесения на кожу человека, целесообразно изучать в виде растворов в этиловом спирте при нанесении на кожу добровольцев.

Метод определения репеллентной активности веществ по отношению к лабораторной культуре комаров в ольфактометре.

Метод основан на реакции бегства комаров при возбуждении и их стремлении лететь к свету. Изучается дистантное репеллентное действие веществ на комаров.

На полоски фильтровальной бумаги или ткани (бязь) размером 2×6 см наносят 0,12 мл 5-20% растворов испытуемых соединений или 0,5% растворов синтетических и натуральных душистых веществ. После полного высыхания, тесты помещают в ольфактометр. Каждую концентрацию испытывают в трех повторностях. Контрольные полоски пропитывают 0,12 мл растворителя. Для опытов используют ольфактометр, основная часть которого состоит из цилиндрической камеры высотой 12 см и диаметром 30 см. Камера имеет по окружности 24 отверстия, в которые впаяны трубки диаметром 2,5 см длиной 6-8 см. Трубки имеют боковые отводки, а на конце Т-образные стеклянные приемники, в которые через трубки вылетают насекомые. Один конец приемников закрывают мельничным газом, другой – пробкой. Внутрь боковых отводов трубок вкладывают полоски тестов, пропитанные раствором изучаемого вещества. Внутри камеры имеется подвижная цилиндрическая шторка высотой 6 см, плотно прилегающая к стенкам ольфактометра. При движении шторки вверх-вниз одновременно закрываются или открываются боковые отверстия приемников с изучаемыми веществами, позволяя или препятствуя комарам, находящимся в камере залететь в трубки и реагировать на пары репеллентов. Ольфактометр помещают в специально оборудованный бокс, где поддерживают оптимальные для комаров условия: температуру воздуха 26±1ºС и относительную влажность 60-70%, и в котором имеется постоянный источник света – лампа в 150 вт.

500 голодных комаров помещают в камеру ольфактометра, открывают, опуская шторку, боковые отверстия, включают электромотор и лампу, расположенную над камерой. Камера медленно вращается вокруг оси для выравнивания освещения. Экспозиция 15 мин. За это время основная часть насекомых покидает камеру и распределяется по трубкам. Для подсчета насекомых, находящихся в трубках, шторку закрывают, а насекомых усыпляют эфиром. Степень отпугивающего действия вещества определяют по числу комаров, залетевших в трубки с обработанными и контрольными полосками, и вычисляют КОД по формуле 12.

При определении длительности отпугивающего действия обработанные полоски испытывают каждые 3-5 суток вплоть до утраты ими репеллентных свойств, когда КОД становится ниже 70%. При изучении быстро испаряющихся веществ (душистые вещества и др.) опыты следует проводить ежедневно.

Метод определения репеллентной активности веществ по отношению к лабораторной культуре блох в ольфактометре.

Метод основан на способности голодных блох прыгать и оставаться длительное время на колеблющихся полосках бумаги или ткани. Изучается контактное репеллентное действие веществ.

На полоски фильтровальной бумаги или ткани (бязь) размером 1,5×14,5 см наносят 0,2 мл 5-20% растворов испытуемых веществ или 0,5-1% растворов синтетических и натуральных душистых веществ. Через сутки, тесты помещают в специальный ольфактометр. Каждую концентрацию испытывают в трех повторностях. Контрольные полоски пропитывают 0,2 мл растворителя.

Опыты проводят в ольфактометре, который представляет собой цилиндрическую камеру с внутренним цилиндром. На оси под верхней

крышкой расположен вращающийся диск. На диске по окружности имеются 24 отверстия, куда вставляют стеклянные трубки с развернутым верхним краем, внутренним диаметром не менее 15 мм. Высота внешнего цилиндра – 15 см, диаметр – 25 см, внутреннего – 15 см и 17 см соответственно. Трубки висят между стенками наружного и внутреннего цилиндров.

При проведении опыта обработанные и контрольные полоски помещают в трубки ольфактометра, чередуя 1 контрольный с 4-5 обработанными, и закрывают сверху пробками. На дно камеры между внешним и внутренним цилиндрами помещают 500 голодных блох. Экспозиция – 20 мин. Для равномерного распределения насекомых диск с трубками вращают с помощью мотора со скоростью 10 оборотов в минуту. Насекомые покидают камеру прибора и распределяются по полоскам в трубках. По окончании экспозиции мотор выключают, трубки быстро извлекают из прибора, помещают в пробирки, расположенные в штативе, блох усыпляют и подсчитывают.

Степень отпугивающего действия веществ определяют по соотношению числа блох, оставшихся на обработанных и контрольных полосках. Коэффициент отпугивающего действия (КОД) вычисляют по формуле 12. При определении длительности отпугивающего действия обработанные полоски испытывают каждые 3-5 суток вплоть до утраты ими репеллентных свойств, когда КОД становится ниже 70%. При изучении быстро испаряющихся веществ (душистые вещества и др.) опыты следует проводить ежедневно.

Метод определения репеллентной активности веществ по отношению к иксодовым клещам на тестах ткани. Метод основан на отрицательном геотаксисе (стремлении ползти вверх), свойственном многим видам иксодовых клещей и, в частности, представителям рода

Ixodes. В опытах используют тесты из хлопчатобумажной ткани (бязи), которые представляют собой ленты 10×70 см, на которых на расстоянии 10 см от края (далее отметка 0) отмечают карандашом участок (участки), подлежащий (подлежащие) обработке репеллентом. Тесты размещают горизонтально на невпитывающей поверхности (стекло, керамическая плитка и т.д.). На опытный тест из пипетки равномерно на определенные участки ленты наносят растворы изучаемого вещества в этиловом спирте. Эталонный тест обрабатывают аналогично опытному, используя раствор ДЭТА. Контрольный тест обрабатывают растворителем. Через 15 мин. после обработки тесты развешивают вертикально для просушки в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности, освещенности. Опыты начинают после полного высыхания тестов (через 1–2 часа после обработки).

Подготовленные к испытанию тесты закрепляют под углом 70° к горизонту. Клещей по одному помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от гипостома. Контрольный тест все клещи должны проползать без остановки. При испытаниях опытного и эталонного тестов регистрируют число клещей, проползших обработанную зону (или зоны). После испытаний клещей помещают в 70% раствор этилового спирта с целью их консервации или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Каждый опыт проводят не менее чем с 30 самками. Результаты опытов сопоставляют с результатами испытаний эталонного теста. КОД, рассчитанный на основании данных испытаний в день обработки, характеризует острое действие репеллентного вещества. Для определения длительности репеллентного действия

(ДРД) испытания повторяют ежедневно до тех пор, пока КОД сохраняется равным или выше 90%.

Возможно два варианта обработки тестов: по отсекающей концентрации и по градиенту концентраций. В первом случае используется тест, на котором на расстоянии 10 см от края (отметка 0) отмечают карандашом полоску длиной 10 см (площадь 100 $см^2$). На опытный тест из пипетки равномерно на отмеченный участок ленты наносят 1 мл 20% раствора изучаемого вещества в этиловом спирте. Эталонный тест обрабатывают аналогично опытному, используя раствор ДЭТА. Рассчитывают КОД, который в данном случае равен % клещей, не проползших обработанную зону от числа клещей в опытном варианте. Это наиболее простой вариант проведения опытов, удобный при необходимости за короткий отрезок времени испытать много веществ.

Градиент концентраций создают обрабатывая зоны по 5 см (площадь 50 $см^2$) одним миллилитром 5-10-20-40% растворов репеллента в этиловом спирте. Первая обработанная зона начинается от отметки 0. Обработанные зоны чередуют с контрольными (необработанными) полосами по 10 см.

Контрольный тест обрабатывают, используя только растворитель. После испарения растворителя все тесты развешивают в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности, освещенности. Опыты проводят в день обработки. Тесты закрепляют под углом 70° к горизонту. Клещей по одному помещают на 5 см ниже первой обработанной полосы и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от гипостома. На контрольном тесте, как правило, все клещи проползают отмеченную зону. При испытаниях

опытного и эталонного тестов регистрируют число клещей, проползших каждую обработанную зону. Отмечают поведение клещей при пересечении обработанных полос. Определяют наименьшую концентрацию, отпугивающую клещей. Удовлетворительными репеллентными свойствами обладает та концентрация, при которой обработанное пространство пересекают не более 10% клещей, от числа взятых в опыт.

После испытаний клещей помещают в 70% раствор этилового спирта с целью их консервации или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Опыт проводят не менее чем с 30 самками.

Определение репеллентной активности веществ по отношению к природным популяциям кровососущих двукрылых методом ольфактометрии. В опытах используют природные популяции кровососущих двукрылых, доминирующих в данной климатической зоне. Конструкция ольфактометра аналогична описанной выше, но его размер и число трубок зависят от того, сколько веществ одновременно исследуется и по отношению к каким видам насекомым. При проведении опытов на комарах и слепнях используют ольфактометр, состоящий из 12-канальной камеры емкостью 1 л и Т-образных трубок диаметром 2,5-3 см, длиной 8-10 см. При проведении опытов на мошках и мокрецах используют ольфактометр с камерой объемом 0,5 л и трубками диаметром 1,5 см и длиной 8 см.

Принцип работы ольфактометра такой же, как и в лабораторных опытах. Полоски фильтровальной бумаги или бязи пропитывают изучаемым препаратом или раствором вещества. Поскольку отпугивающие свойства веществ и реакция на них насекомых изменяются под влиянием различных факторов, в каждый опыт обязательно включают эталон (ДЭТА) и контроль. Каждое вещество

изучают в 3 повторностях. Контрольными служат полоски фильтровальной бумаги или бязи, пропитанные растворителем.

Насекомых для опытов собирают в ловушки или сачками. Чтобы насекомых меньше травмировать при сборах, сачки снабжают приемником – трубкой, вставленной в узкий конец сачка. В ольфактометр помещают 500 мошек или мокрецов, 100 комаров или 50-100 слепней. В период постановки опытов регистрируют температуру, влажность воздуха, освещенность.

Коэффициент отпугивающего действия (КОД) определяют по соотношению числа насекомых, залетевших в контрольные трубки и трубки с обработанными тестами (формула 12). Соединения и препараты, у которых установлен широкий спектр отпугивающего действия при КОД не менее 90%, отбирают для проведения испытаний на обработанной ткани.

Метод определения репеллентной активности веществ по отношению к природным популяциям кровососущих двукрылых при обработке ткани. Полоски марли размером 20×50 см площадью 1000 $см^2$ пропитывают 10-20% спиртовыми растворами репеллентов из расчета 20 г на 1 $м^2$ ткани.

Первое определение отпугивающего действия тестов проводят через сутки после обработки, последующие – один раз в 3-5-7 дней. В промежутках между опытами тесты хранят в вертикальном положении на открытом воздухе под навесом в условиях, обеспечивающих свободное испарение вещества.

Испытания проводят в местах массового нападения кровососущих насекомых. До начала исследований и в период проведения опытов проводят учеты численности насекомых и их сбор (сачком или эксгаустером) для определения доминирующих видов, регистрируют

метеорологические факторы (температура и влажность воздуха, сила ветра, освещенность, давление). Интенсивность нападения кровососов на человека определяют путем подсчета числа насекомых, севших на обнаженное предплечье (голень) испытателя в течение 20 мин. (4 раза по 5 мин.) через каждый час в период суточной активности кровососущих насекомых.

Эффективность репеллента определяют в часы максимальной активности доминирующих видов при интенсивности их нападения на обнаженное предплечье (голень) испытателя не менее 25-30 особей за 5 мин. Испытания проводят не менее 3 человек (один испытывает опытный образец, второй – эталон, третий – контроль). Испытатели с опытной и эталонной полосками ткани располагаются с подветренной стороны от контрольного на расстоянии не менее 5 м от него и друг от друга в условиях равномерного освещения. Полоски ткани размещают на обнаженном предплечье (голени) и подсчитывают число кровососов, садящихся на них в течение 15 мин. (три раза по 5 мин.).

Величину репеллентного действия препарата определяют по показателю КОД. Острое репеллентное действие характеризует КОД, установленный в 1-е сутки после обработки тестов. В качестве эталона используют ДЭТА в аналогичной концентрации.

Определение длительности репеллентного действия обработанной ткани проводят периодически в течение 1-3 месяцев. Вещество считают неэффективным, когда его КОД опускается ниже 70%.

2.3. Методы определения активности инсектицидных средств.

2.3.1. Методы оценки эффективности инсектицидных средств, предназначенных для борьбы с нелетающими синантропными насекомыми

Метод оценки активности липкой ловушки без инсектицидов в виде домиков для борьбы с тараканами. Оценка эффективности липких ловушек проводится на рыжих тараканах инсектарной культуры.

Для этого используется бокс из оргстекла 20×20×30 см или полигоны 60×40×15 см, на верхнюю часть внутренней поверхности которых нанесена полоска вазелина шириною 2 см, препятствующая выползанию насекомых. В бокс (полигон) помещают по 20 самок, 20 самцов и 80 личинок II-IV возрастов. Снимают бумагу и освобождают липкую поверхность ловушки. Вскрывают пакетик с пищевой приманкой и помещают ее в центре ловушки (если приманка не находится в ловушке под защитной бумагой). Ловушку помещают в центре бокса (полигона), в боксе (полигоне) располагают поилку с водой и альтернативное укрытие. Учеты эффективности проводят через 1-5 часов, и далее через 1, 2, 7 и 14 дней и далее при необходимости. Повторность опыта трехкратная. Параллельно ставят контрольный вариант: в бокс (полигон) помещают альтернативный корм на подложке (кусочек белого хлеба с подсолнечным маслом), поилку с водой и. альтернативное укрытие.

Показатели эффективности: средняя уловистость на 7 сутки – не менее 90%; на 14 сутки – не менее 95%; ресурс ловушки – 1 рыжий таракан/см^2; срок действия не менее 15 суток.

Метод оценки активности инсектицидных пищевых приманок применяемых в борьбе с тараканами (в виде контейнеров – приманочных станций, таблеток, шариков, брикетов, гранул, порошка,

пасты, гелей и др.). Оценка эффективности пищевых приманок проводится на рыжих тараканах. Для этого используется полигоны (контейнер размером 60×40×15 см), на верхнюю часть внутренней поверхности которых нанесена полоска вазелина шириною 2 см, препятствующая выползанию насекомых. В контейнер помещают по 20 самок, 20 самцов и 80 личинок II-IV возрастов тараканов; после этого там же располагают пищевую приманку либо готовую к применению, либо массой 0,5-3,0 г на подложке, поилку с водой и убежище. Параллельно ставят контрольный вариант: в полигон помещают пищу (кусочек белого хлеба с подсолнечным маслом), поилку и убежище. Повторность опытов трехкратная, при температуре 20-22ºС и относительной влажности воздуха 50-70%. Учет гибели ведут ежедневно. Для изучения остаточного действия проводят подсадку новой экспериментальной группы насекомых через 7, 14, 21, 28 и более суток.

Учет поедаемости приманки ведут путем ее ежедневного взвешивания с точностью до 0,001 г. Поскольку приманка в первые несколько суток теряет влагу, входящую в рецептуру, учитывают потерю массы средства в сравнении с массой контрольного варианта (в отсутствие тараканов).

Метод оценки активности инсектицидных гелей.

При испытании гелей опыты могут быть заложены в двух модификациях:

а) нанесение геля в виде пунктирной линии по периметру сосуда (1,5 см геля с 4-10 см интервалом);

б) помещение геля массой 0,5-1,5 г на подложку.

Испытания ведут в стеклянных кристаллизаторах (D=30 см). Рыжих тараканов помещают в кристаллизатор по 20 шт. (10 самцов и 10 самок). Учеты ведут аналогично вышеописанному.

Показатели эффективности:

а) ДВ – ФОС, карбаматы, пиретроиды, фенилпиразолы (фипронил): острое действие – гибель насекомых на 2 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 30 суток;

б) ДВ – имидаклоприд (гель): острое действие – гибель на 3 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

в) ДВ – гидраметилнон или другой гидразон, борная кислота, сульфторамид, перфтороктансульфонат лития, тиаметоксам, авермектины: острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%, длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

г) ДВ – борная кислота, бура (гель): острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%, длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

д) ДВ – борная кислота, бура (жидкие приманки): острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%, длительность остаточного действия – не менее 10 суток.

Метод оценки активности средств в аэрозольных или беспропеллентных упаковках по отношению к нелетающим членистоногим. Эксперименты проводят в камерах объемом 1 $м^3$, снабженных вентиляционной системой. Дно камеры выстилается фильтровальной бумагой. Температура в камере при проведении экспериментов составляет 22-25°С при относительной влажности не менее 50% и не более 70%. Для характеристики эффективности средств в аэрозольных и беспропеллентных аэрозольных упаковок с

механическим распылителем определяется острое действие и период остаточного действия.

Определение острого действия.

Для определения острого действия используют имаго рыжих, черных и американских тараканов, которых помещают в 0,5 литровые емкости по 10 экземпляров (5 самок и 5 самцов), постельных клопов и их яйца 1-4-дневного эмбрионального развития помещают в стеклянные экспозиметры (H = 5 см, D = 4,5 см), которые располагают на стеклах 10×10 см, покрытых фильтровальной бумагой.

Насекомых и поверхности орошают препаратом из баллона с высоты 20 см, направляя струю аэрозоля под углом 45° ко дну камеры. Насекомых и поверхности удаляют из камеры через 10 мин. после орошения. Насекомых переносят в чистую посуду. За их состоянием наблюдают, отмечая через 5, 10, 30 мин., 1, 2, 4 часа и далее ежедневно в течение 2-5 суток число насекомых без внешних признаков паралича, парализованных и погибших. Энтомологическую оценку каждой рецептуры наполнителя аэрозольных баллонов или беспропеллентных упаковок проводят в 3 повторностях. Норма расход препарата составляет 10-20 г на 1 $м^2$ обрабатываемой поверхности в зависимости от состава рецептуры средства. Отклонение от средней величины расхода препарата не должно превышать 5%. Расход препарата определяют путем взвешивания баллона (упаковки) до и после опыта.

Определение остаточного действия.

Для определения остаточного действия отложений аэрозоля в пяти точках дна камеры располагают тест-поверхности (стеклянные или из фанеры, или из других типов материалов размером 10×20 см. Эти обработанные поверхности после обработки и подсушки хранят в вертикальном положении при комнатной температуре и периодически

на них проводят подсадку имаго рыжих тараканов и постельных клопов и др. для выявления длительности инсектицидного действия. Остаточное действие отложений аэрозолей определяют через 1, 2, 3 суток и далее при наличии длительного остаточного действия через каждые 7 дней в течение 28 суток и более после контакта тараканов с обработанными поверхностями в течение 15 мин. с помощью экспозиметров Набокова-Ларюхиной или в течение 1 часа и более в экспозиметрах с D=85 мм, согласно рекомендациям CSMA. Насекомых после контакта с обработанными пластинками переносят в чистые сосуды и регистрируют их состояние в течение 24, 48 и 72 часов в зависимости от химической структуры действующих веществ. Остаточное действие считают законченным, когда смертность насекомых составляет менее 50%.

Показатели эффективности: острое действие – гибель тараканов через 10 мин. не менее 30%, через 24 часа – не менее 100%, длительность остаточного действия – 5-60 суток.

Метод оценки активности пиротехнических средств, предназначенных для борьбы с нелетающими насекомыми и имаго комнатных мух.

Оценка эффективности пиротехнических средств проводится на рыжих тараканах, крысиных блохах, постельных клопах и комнатных мухах инсектарных культур в специальных экспериментальных помещениях, так как они рассчитаны на применение в помещениях большого объема, а нарушать строение средства нельзя, поскольку при этом меняется термодинамика и получаются искаженные результаты испытаний.

На пол помещения на разном расстоянии от испытуемого средства в 5 точках размещают: емкости объемом 200-500 мл, в которых

помещено по 20 имаго тараканов (10 самок и 10 самцов), стеклянные экспозиметры (Н – 5см, D – 4,5 см) с клопами по 10 шт., высокие стеклянные сосуды с блохами по 30 шт., садки из фатина с комнатными мухами 3-5 дневного возраста по 100 шт. Во время испытаний температуру воздуха поддерживают в режиме 22±2°С, во избежание возбуждающего или угнетающего влияния температуры, относительную влажность поддерживают в пределах 70-90%.

На подложку из негорючих материалов помещают пиротехническое средство. Средство поджигают, помещение закрывают, выдерживают в течение 2 часов, после чего подсчитывают пораженных насекомых и переносят их в чистую посуду, учет гибели проводят через 24 часа.

Показатели эффективности: острое действие – гибель через 24 часа тараканов – не менее 90%, блох –100%.

Метод оценки активности инсектицидных дустов для нелетающих насекомых и имаго комнатных мух.

Оценка эффективности инсектицидных дустов проводится на рыжих тараканах и других нелетающих насекомых и комнатных мухах инсектарной культуры.

Различные навески дуста для выбора нормы расхода данного средства из расчета не на 1 м^2, а на площадь тест-поверхности наносят на пластинки из фанеры размером 10×20 см (площадь 200 см^2). Навеску дуста равномерно распределяют по площади пластинки. Насекомых подсаживают в экспозиметрах на обработанную поверхность на 30 сек., затем их переносят в чистые стаканы. Кратковременность выбранного контакта связана с тем, что дуст быстро налипает на насекомых, поэтому не следует увеличивать экспозицию, поскольку дуст, находящийся на теле насекомого продолжает действовать после

пересадки их в чистый стакан. При определении острого действия подсадку насекомых проводят сразу после нанесения дуста. Учет гибели ведут через 24-48 часов. При определении остаточного действия насекомых подсаживают через 1, 3 и более суток после обработки поверхности до окончания инсектицидного действия. Учет гибели насекомых после подсадки также ведут через 24-48 часов.

Показатели эффективности: острое действие: гибель тараканов, мух через 24 часа – 100%; длительность остаточного действия – 7-90 суток.

Метод оценки активности инсектицидных карандашей, мелков, брусков.

Используется в качестве тест-поверхности пластинка из фанеры размером 10×20 см (площадь 200 $см^2$), которую взвешивают и результаты записывают. Предварительно рассчитывают норму расхода для тестируемого средства не на 1 $м^2$, а на площадь тест-поверхности, как указано выше. Инсектицидным карандашом или бруском закрашивается тест-поверхность. Для контроля нормы расхода обработанную пластинку взвешивают. При необходимости средство удаляют или же добавляют. При определении острого действия подсадку насекомых в экспозиметрах проводят сразу после нанесения средства на 30 сек., затем их переносят в чистые стаканы. Учет гибели ведут через 24 часа. При определении остаточного действия насекомых подсаживают на 30 сек. через 1, 3 и более суток после обработки поверхности до окончания инсектицидного действия. Учет гибели насекомых также ведут через 24-48 часов.

Показатели эффективности: острое действие – гибель тараканов через 24 часа 100%; длительность остаточного действия – 7-60 суток.

Метод определения активности инсектицидных карандашей, мелков, брусков для тараканов.

Берется емкость (таз или кристаллизатор) диметром не менее 30 см. Из оберточной бумаги вырезают круг, диаметр которого соответствует диаметру таза. На круге производится предварительная разметка канцелярским карандашом – наносится 6 окружностей. Диаметр первой составляет 4 см, диаметр каждой последующей увеличивается на 2 см. Бумажный круг взвешивают и результаты записывают. Предварительно рассчитывают площадь 3 концентрических полос на каждом круге по формуле 15.

Для нашего примера упрощенный расчет выглядит так:

$$S = \frac{3,14}{2}(14^2 - 12^2 + 10^2 - 8^2 + 6^2 - 4^2) = 169,56 \text{ см}^2$$

В соответствии с рекомендуемыми нормами расхода инсектицидного средства на 1 $м^2$ обрабатываемой поверхности рассчитывается количество средства, наносимого на концентрические полосы. Так, при норме расхода 5 $г/м^2$ в рассматриваемом случае должно быть нанесено 85 мг средства. Далее инсектицидным карандашом или мелком закрашиваются 3 концентрических полосы. Для контроля нанесенной нормы бумажный круг с нанесенным средством вновь взвешивают. При необходимости средство удаляют или добавляют.

При определении острого действия в центр бумажного круга, помещенного в емкость, края которой смазаны вазелином, из пробирки выпускают 10 имаго рыжих тараканов (5 самцов и 5 самок). Тараканы разбегаются и прячутся под бумажный круг. При этом время контакта насекомых с обработанной поверхностью составляет 3-5 сек. Затем круг

аккуратно вынимают и собирают тараканов в чистые стаканы. Учет гибели ведут через 24 часа. Опыты ставят в 3-5 кратной повторности.

При определении остаточного действия бумажные круги с нанесенным средством хранят 3 и более суток в горизонтальном положении вдали от солнечных лучей. Для определения продолжительности остаточного действия описанный выше процесс повторяют через 3 и более суток в зависимости от продолжительности остаточного действия или выбранных экспериментатором экспозиций.

Показатели эффективности: острое действие – гибель тараканов через 24 часа не менее 50%; длительность остаточного действия – 7-60 суток.

Определение пулецидной активности инсектицидов.

Описанные ниже способы определения пулецидной эффективности порошковидных и жидких инсектицидов могут применяться не только в стационарных лабораториях, но и в полевых условиях, не требуют наличия сложного лабораторного оборудования и могут быть использованы даже в полевых условиях. Полезны для быстрого подбора наиболее эффективных инсектицидных средств полевой и поселковой дезинсекции в любом конкретном регионе из числа имеющихся препаратов, а также для ориентировочного определения их остаточного действия.

Определение пулецидной активности порошковидных инсектицидов. В четыре стеклянных цилиндра (два контрольных) высотой 25-30 см насыпают чистый песок слоем 3 см. Затем в песок двух цилиндров вносят испытываемый препарат из расчета применяемой дозы ДВ на 1 $м^2$ площади (площадь дна цилиндра определяется по формуле $S = \pi R^2$). Препарат тщательно перемешивают с песком. После этого во все цилиндры помещают по 10 блох

(лабораторных культур или природных популяций), предпочтительно вида Pulex irritans. Возможно использование других видов блох (Xenopsylla cheopis, Ctenocephalides felis).

Блох выдерживают на поверхности задустированного песка в зависимости от группы, к которой принадлежит испытываемый инсектицид: фосфорорганические – 20 мин., карбаматы – 10 мин., пиретроиды – 1 мин. После указанной экспозиции на субстрате с дустом блох переносят в запасные чистые цилиндры. Результаты учета записываются через 3 (пиретроиды), 24 и 48 часов. Гибель блох в контрольном варианте не должна превышать 5%. Опыт проводится в двух повторностях при температуре 20-26±2°С и относительной влажности не ниже 65%.

Показатели эффективности: препарат считается пригодным для полевой дезинсекции если при учете через 3-24 часа гибель насекомых составляет около 50%, а через 48 часов – 95-100%.

Определение пулецидной активности методом опыленных пробирок.

Определение биологической активности инсектицидных дустов может быть произведено и более простым методом опыленных пробирок. Для этого берут 6 чистых пробирок, в 2 из них помещают по 10 контрольных блох. В остальные пробирки засыпают пятиграммовую навеску инсектицидного дуста. Заткнув отверстия пробирок, 3-4 раза переворачивают их так, чтобы стенки опылились равномерно. После этого дуст высыпают и, перевернув пробирки отверстием вниз, легкими постукиваниями удаляют излишки препарата. В конечном итоге внутренняя поверхность пробирок должна выглядеть слегка затуманенной дустом.

В подготовленные таким образом пробирки помещают по 10 блох в каждую и выдерживают их с уменьшенной в два раза, по сравнению со стеклянными цилиндрами, экспозицией. После этого блохи перекладываются в чистые пробирки (каждый десяток – в отдельную). Результаты опыта записываются и оцениваются так же, как и в первом случае через 3, 24 и 48 часов.

Определение пулецидной активности жидких инсектицидов.

Для работы необходимы эмалированный таз, бумажный круг, соответствующий по величине дну таза, 6-8 пробирок. В опыт берутся 60-100 блох одного вида из инсектария, либо из естественных местообитаний; 20 блох оставляют в двух пробирках в качестве контроля, а остальных используют в эксперименте.

Испытываемый препарат наносят на поверхность бумаги с помощью кисти или опрыскивателя в пересчете рекомендованных для помещений концентрации и дозы АДВ на площадь круга. После просушивания бумажный круг укладывается на дно таза, обработанной поверхностью наружу. На бумажный круг помещают 30-50 блох и прикрывают их чашкой Петри (диаметр чашки Петри 10 см) во избежание расползания. Через 30 мин. контакта с бумагой, обработанной инсектицидом, блох стряхивают в таз, откуда рассаживают в пробирки по 10 экз.

Испытания проводятся в двух повторностях с использованием того же импрегнированного бумажного круга. Результат опыта учитывается через 24 часа. При этом в двух повторностях гибель блох должна составлять не менее 98%. В этом случае испытываемый препарат считается пригодным для дезинсекции в рекомендуемых дозировках. Гибель блох в контроле не должна превышать 5%. Опыты

проводят при температуре 20-26±2°С и относительной влажности не ниже 65%.

Если процент гибели блох колеблется от 50 до 98, то целесообразно удвоить концентрацию АДВ, либо, если это невозможно, удвоить количество препаративной формы инсектицида на бумажном круге. Получение в этих случаях высокой эффективности в опыте дает основание применять данную препаративную форму для дезинсекции в повышенной концентрации. Если и при повышенной концентрации пулецидная эффективность окажется ниже 98%, то инсектицид следует признать непригодным для поселковой дезинсекции.

Этим методом можно определять также минимальную экспозицию инсектициды, обеспечивающую нужные показатели гибели блох. При этом с помощью импрегнированного бумажного круга время контакта блох с данной препаративной формой может быть точно дозировано от моментального (2-3 сек.) до многосуточного.

Метод оценки активности средств, применяемых методами опрыскивания (концентраты эмульсий, микрокапсулированные, микро- и макроэмульсии, смачивающиеся и растворимые порошки, формы флоу, суспоэмульсии, водные растворы и др.) для борьбы с насекомыми.

Оценка эффективности концентратов, из которых готовят рабочие жидкости для борьбы с насекомыми проводится на тараканах и других насекомых инсектарных культур. В том случае, если средство предназначено для уничтожения определенного вида членистоногого, испытания проводят именно на этом объекте.

Образец средства, представленный для определения его активности, интенсивно взбалтывается и на весах берется навеска для приготовления серии концентраций. Путем разбавления водой

готовятся необходимые концентрации. Опыты проводят на насекомых в камере объемом 1 $м^3$, снабженной вентиляционной системой. На дне камеры на площади 0,5 $м^2$ по постоянной схеме равномерно размещают в 5 точках по 10 экземпляров тараканов, (соотношение самок и самцов 1:1) которых помещают в сосуды объемом 0,5 л, постельных клопов и их яйца в экспозиметры, описанные выше.

Для установления остаточного действия отложений средства образцы поверхностей – пластинки стекла и фанеры размером 10×20 см помещают в камеры в количестве не менее 5 штук каждой. Насекомых и поверхности орошают препаратом из пульверизатора или опрыскивателя типа «Росинка» или «Квазар» с высоты 20 см, направляя струю средства под углом 45° ко дну камеры. Температура в камере во время опытов должна быть постоянной 22±2°С, относительная влажность – не менее 50% и не более 70%.

Насекомых и поверхности удаляют из камеры через 10 мин. после орошения. Норма расхода рабочей жидкости из расчета 50 мл/$м^2$. Насекомых переносят в чистую посуду. За их состоянием наблюдают, отмечая через 10, 30 мин., каждый час и далее ежедневно в течение 3 суток количество насекомых без внешних признаков паралича, парализованных и погибших. Расход препарата определяют или предварительно, беря 50 мл рабочей жидкости при обработке стекла и 100 мл при обработке фанеры, или путем взвешивания опрыскивателя до и после проведения опрыскивания.

Остаточное действие отложений средства определяют на 1, 3, 5, 7 сутки и более после обработки методом контакта тараканов с обработанными поверхностями в течение 15 мин. (мух, блох – 5 мин.) в экспозиметрах. Насекомых после контакта с обработанными

пластинками переносят в чистые сосуды и регистрируют их состояние через 24-48 часов.

Показатели эффективности: острое действие – гибель членистоногих через 24 или 72 часа 100%, длительность остаточного действия – 7-60 суток;

2.3.2. Методы оценки активности средств, применяемых для борьбы с муравьями

Оценку эффективности средств, применяемых для борьбы с муравьями проводят на рабочих особях рыжих домовых муравьев Monomorium pharaonis L. лабораторной культуры, при отсутствии инсектарной культуры – на особях из природных популяций, отлов рабочих особей которых проводят в натурных условиях с помощью эксгаустера. Возможно использование муравьев природных популяций других видов – чёрных садовых Lasius niger L. и (или) муравьев Myrmica rubra L. При отсутствии муравьев используют самцов рыжих тараканов чувствительной лабораторной расы.

Средства для уничтожения муравьев контактного типа действия.

К этим средствам относятся все препаративные формы инсектицидов контактного типа действия, предназначенные для уничтожения комплекса нелетающих насекомых, оценку их активности в отношении рабочих особей муравьев проводят методом опрыскивания или свободного контакта с обработанной поверхностью. Остаточное действие проверяют при подсадке муравьев еженедельно, до снижения эффективности ниже 70%.

Пищевые приманки для уничтожения муравьев.

Инсектицидные пищевые приманки (жидкие, в виде приманочных станций-контейнеров, порошка, гранул, пасты, геля и т. д.) могут быть

неспецифическими – уничтожающими преимущественно рабочих особей муравьев и специфическими – уничтожающими всю колонию.

Метод определения инсектицидной активности приманок для рабочих особей муравьев. Опыты проводят методом группового кормления. Для этого в зависимости от типа приманки используют открытые чашки Петри, лабораторные стаканы, любые другие стеклянные или пластмассовые емкости достаточного размера. Края тщательно смазывают вазелином. В емкость помещают поилку с водой (смоченную вату), убежище (лист бумаги в виде неплотно свернутой трубочки), инсектицидную приманку (порошок, гранулы, пасту, гель и т.д. на подложке; контейнер с приманкой; жидкость, которой смачивают вату).

После размещения приманки в емкость запускают по 100 рабочих особей муравьев. Для предотвращения выползания муравьев, кроме нанесения вазелинового масла, емкости дополнительно прикрывают стеклом. Опыты проводят при естественном свето-темновом режиме и комнатной температуре в 3 повторностях. В контрольном варианте используют поилку с водой и корм (мед, варенье, фарш).

Наблюдение за состоянием насекомых с учетом парализованных (погибших) особей начинают через несколько минут после их внесения в емкость и продолжают в течение первых 1-3 часов, для того, чтобы выявить неспецифические инсектицидные приманки, которые из-за своего очень быстрого действия на рабочих особей либо не достигают колонии, либо не распространяются в ней посредством трофаллаксиса. Далее учет гибели проводят каждые 24 часа в течение 2-5 суток в зависимости от типа применяемого действующего вещества.

При использовании в качестве тест-объекта самцов рыжих тараканов чувствительной лабораторной расы продолжительность

эксперимента может быть увеличена до 21 суток, опыты проводят в полигонах размером 60×35×15 см. При необходимости в контейнер помещают альтернативный корм.

Показатели эффективности:

а) ДВ – ФОС, карбаматы, пиретроиды, фенилпиразолы (фипронил): острое действие – гибель на 2 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 30 суток;

б) ДВ – имидаклоприд (гель): острое действие – гибель на 3 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

в) ДВ – гидраметилнон или другой гидразон, борная кислота, сульфторамид, перфтороктансульфонат лития, тиаметоксам, авермектины: острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

г) ДВ – борная кислота, бура (гель): острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 90 суток;

д) ДВ – борная кислота, бура (жидкие приманки): острое действие – гибель на 5 сутки не менее 70%; длительность остаточного действия – не менее 10 суток.

Метод изучения активности специфических пищевых приманок на колониях рыжих домовых муравьев.

Для оценки эффективности средства в отношении всей колонии отбирают только те средства, которые вызывают гибель не менее 70% рабочих особей, но не ранее, чем через 1-3 часа. Изучение эффективности средства в отношении всей колонии проводят с использованием колоний, взятых из лабораторной культуры рыжих домовых муравьев, которые состоят из нескольких сотен (до 1000) рабочих особей и нескольких самок с расплодом.

Колонию помещают в сосуд типа аквариума объемом 0,03-0,05 м3, края стенок которого тщательно смазывают вазелином. В аквариум помещают поилку с ватой, смоченной водой, и корм для насекомых (вареный желток, яйца мух, вареное мясо, рыба), лист бумаги в виде неплотно свернутой трубочки (убежище для муравьев). Контролем служат аналогичные помещенные в аквариум колонии. Жидкую инсектицидную приманку наливают в чашку объемом 10 мл с ватным тампоном. Периодически тампон увлажняют, подливая питьевую воду. Другие типы приманок помещают либо на подложке по 0,5-1,5 г (можно несколько подложек в разных частях экспериментальной емкости), либо в контейнере. По мере продолжения эксперимента приманку следует периодически заменять, прежде всего, если визуально отмечено резкое снижение количества подходов к ней рабочих особей, или в случае заметного снижения количества приманки. Учет гибели насекомых (отдельно рабочих особей и отдельно самок) и визуальную оценку уменьшения расплода проводят через определенные промежутки времени вплоть до полной гибели колонии (как правило, от нескольких недель до 1,5-2 месяцев).

2.3.3. Методы определения активности инсектицидных средств, предназначенных для борьбы с летающими синантропными насекомыми

Метод оценки эффективности клейких (липких) ловушек в виде листов, лент и палочек для борьбы с летающими насекомыми (мухи, моль, огневки). Оценка эффективности липких листов и палочек проводится на комнатных мухах, платяной моли, огневках инсектарных культур. Для этого используются большие садки 50×50×50 см, представляющие собой каркасы с натянутыми на них марлевыми

садками или садками из мельничного газа или камеры объемом 1 м^3. Липкие листы, предварительно разъединив или сняв с них защитный бумажный слой, помещают по одному в садок или камеру. Липкие палочки или липкие ленты освобождают от защитного слоя бумаги или гильзы и также подвешивают в садке или камере. В садок выпускают 100 особей, в камеру – по 300 особей. Повторность опыта трехкратная. Количество прилипших особей подсчитывают в динамике: через 3-5 часов, 1 и 2 суток и далее в зависимости от необходимости.

Показатели эффективности: для комнатных мух – средняя уловистость на 2 сутки не менее 95%, ресурс ловушки 1 особь/см2, срок действия не менее 15 суток; для огневок и платяной моли – средняя уловистость на 2 сутки не менее 70%, ресурс ловушки 1 особь/см2, срок действия не менее 30 суток

Метод оценки активности пищевых инсектицидных приманок (жидких, сухих сахарных, гранулированных) для борьбы с мухами.

Оценка эффективности пищевых приманок проводится на комнатных мухах инсектарной культуры. Для этого используются большие садки 50×50×50 см, представляющие собой каркасы с натянутыми на них марлевыми садками или садками из мельничного газа или специальные боксы объемом 0,5-1,0 м^3. В центре садка (бокса) размещают емкость с жидкой приманкой или на подложку по помещают 2-3 г сухой формы приманок (порошок, пена, паста, гранулы). Сахарную приманку наносят на стеклянную, фанерную или другие типы поверхностей и дают им подсохнуть, затем помещают в бокс или садок. Параллельно ставят контрольный вариант: в садки (боксы) помещают сосуд с 5% сахарным сиропом и выпускают 100 мух. Учитывают гибель мух через 1, 2, 4, 24 часа, а далее в зависимости от цели эксперимента.

Первичную оценку приманок можно проводить экспресс-методом определения эффективности приманок в отношении комнатных мух: сухую приманку помещают на кусочек картона площадью 1 $см^2$ и кладут его на дно стакана. В стакан запускают одну муху, затягивают сверху марлей и фиксируют время посадки на приманку и время наступления поражения и гибели особи. Повторность опыта 5-10 кратная.

Показатели эффективности:

а) ДВ – ФОС (кроме хлорофоса), пиретроиды, неоникотиноиды: острое действие –гибель мух через 24 часа 100%; длительность остаточного действия – 15-60 суток;

б) ДВ – хлорофос: острое действие – гибель не менее 80% мух через 24 часа; длительность остаточного действия – не менее 14 суток.

Метод оценки инсектицидной активности средств в аэрозольной упаковке по отношению к летающим насекомым (мухи, комары).

Оценка эффективности средств в аэрозольной упаковке проводится на комнатных мухах или комарах инсектарной культуры.

В камеру объемом 2 $м^3$ выпускают 300 насекомых, во время испытаний температуру воздуха поддерживают в режиме 22±2°С, чтобы избежать излишне возбуждающего или угнетающего влияния температуры, относительную влажность – не менее 50% и не более 70%. При изучении каждой рецептуры ставят не менее 5 опытов. Струю аэрозоля из баллона направляют в камеру, расход смеси не должен превышать 1 $г/м^3$. При помощи секундомера определяют время (Т) поражения 99% насекомых. Определяют концентрацию (С) инсектицида в воздухе по формуле 16. Эффект определяют по импульсу концентрации (С×Т), где Т – время поражения 99% насекомых, для

которого устанавливают среднеарифметическую величину и ее доверительные границы при P=0,05.

Критерием оценки эффективности аэрозолей служит условно принятая величина концентрации инсектицида в воздухе C_{15}, мг/м^3, (формула 17), которая вызывает поражение 99% мух или комаров в течение условно принятого времени – 15 минут и Q_{15}, мг/м3 – количество смеси, выпущенное из баллона, вызывающее поражение 99% насекомых за 15 мин. (формула 18), а также величина $КТ_{50}$ – время поражения 50% особей. Величина $КТ_{50}$ вычисляется графически (или по формуле 22).

Показатели эффективности: острое действие на мух C_{15} – не более 15 мг/м3; Q_{15} – не более 1000 мг/м3; $КТ_{50}$ – не более 10 мин.

Методы определения активности средств в виде спиралей (и др. средств фумигационного типа) для борьбы с летающими насекомыми.

Оценку активности средств в виде спиралей для комаров проводят на имаго желтолихорадочного комара Ae. aegypti или подвальных комаров Cx. pipiens molestus инсектарных культур в возрасте 14-20 дней, выведенных на углеводном питании; для мух – на 3-дневных имаго комнатных мух M.domestica.

Метод определения $КТ_{50}$.

В чистую камеру объемом 0,5 м^3 запускают 100±5 самок комаров Температура в камере 25±2°С. Спираль поджигают и через 30 сек. устойчивого горения пламя задувают, дымящую спираль помещают в камеру и немедленно включают секундомер. С помощью секундомера регистрируют время начала нокдауна – паралич первого комара (1%) в камере и время нокдауна предпоследнего комара (99%). По этим показателям графическим методом определяют время наступления

нокдауна у 50% особей ($КТ_{50}$, мин.). Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ графически (или по формуле 22).

Метод определения $КТ_{50}$ для комнатных мух.

Оценку проводят в боксах или специальных помещениях объемом не менее 10 $м^3$. Мух по 100 особей в садках, из мелкоячеистой сетки (фатин) помещают на высоте 1,5 м в трех точках помещения. Опыт проводят при температуре 25±2°С. Спираль поджигают и через 30 сек. устойчивого горения пламя задувают, немедленно включают секундомер. С помощью секундомера регистрируют время начала нокдауна – паралич первой мухи (1%) и время нокдауна предпоследней мухи (99%). По этим показателям графическим методом определяют время наступления нокдауна у 50% особей ($КТ_{50}$, мин.). Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ графически (или по формуле 22).

Метод определения смертности для комнатных мух.

После экспозиции в течение 3 часов садки выносят в чистое помещение и оставляют на 24 часа для учета смертности насекомых.

Метод оценки резерва спирали.

Для определения резерва спирали (максимального времени использования спирали) сжигают спираль полностью на открытом воздухе, определяют время полного сгорания.

Показатели эффективности спиралей:

а) $КТ_{50}$ для комаров – не более 7 мин.; резерв спирали для комаров – не менее указанного в НТД;

б) $КТ_{50}$ для мух – не более 60 мин.; смертность через 24 часа – не менее 80%; резерв средства для мух – не менее указанного в НТД.

Фумигационные средства для борьбы с комарами в виде инсектицидных бумаг, пластин для фонарей со свечой, пропитанных летучим инсектицидом полимерных носителей и др.

Подобные средства испытываются в помещении рекомендованного производителем объема. Определяют $КТ_{50}$. (графически или по формуле 22) и смертность насекомых через 24 часа.

Показатели эффективности: $КТ_{50}$ для комаров – не более 30 мин.; смертность через 2 часа не менее 80%. Резерв средства для комаров – не менее указанного в НТД; при испытании в камере $КТ_{50}$ – не более 2 мин.

Метод оценки инсектицидной активности антикомариных средств в форме свечей.

Эксперименты проводятся в лабораторных условиях при температуре 20-25°С в экспериментальных пластмассовых камерах объемом 1 $м^3$, поверхности которых должны быть без стыков, чтобы комары не могли в них спрятаться. Объектом исследований являются имаго комаров Ae. aegypti и C. pipiens инсектарных культур.

В камеру впускают 100 имаго комаров, в центре нижней поверхности камеры помещают опытную свечу, которую поджигают. Свеча должна гореть не более 6 мин., после чего ее гасят. При проведении эксперимента фиксируют температуру воздуха в камере до начала эксперимента и после того, как свечу загасили. Перед зажиганием и после гашения свечу взвешивают. Повторность эксперимента трехкратная. В качестве контрольного варианта используют стандартную свечу без инсектицида. Динамику гибели комаров отслеживают с интервалом 5, 10 и 15 мин. Затем рассчитывают величины $КТ_{50}$ и $КТ_{90}$, мин. (время горения свечи, обеспечивающее гибель 50% и 90% комаров в течение 15 мин. после ее гашения), а также величину $КТ_{50}$, мин. (по формуле 22 или графическим способом).

Показатели эффективности: гибель комаров через 15 мин. после гашения свечи не менее 90%.

Методы определения активности электрофумигаторов для борьбы с летающими насекомыми.

Оценку активности инсектицидов для комаров проводят на имаго желтолихорадочного комара Ae. aegypti или подвальных комаров Cx. pipiens molestus инсектарных культур в возрасте 14-20 дней, выведенных на углеводном питании; для мух – на 3-дневных имаго комнатных мух M.domestica.

Электрофумигаторы с матами (пластинами).

Метод определения $КТ_{50}$.

В чистую камеру объемом 1 $м^3$ (для мух – 2 $м^3$) запускают 100±5 комаров (200±10 имаго мух) без разделения по полу. Температура в камере 25±2°С. Электрофумигатор (нагревательное устройство) включают в электрическую сеть согласно инструкции за 15 мин. до начала опыта. Инсектицидный мат (пластину) помещают на нагревательную поверхность и сразу размещают электрофумигатор с пластиной в камере с комарами. С помощью секундомера регистрируют время начала нокдауна у первого комара (мухи) в камере и время нокдауна у 99% комаров (мух). По этим показателям графическим методом или по формуле 22, определяют время наступления нокдауна у 50% особей ($КТ_{50}$, мин.). Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ (по формуле 22 или графическим способом) и статистическую ошибку.

Метод оценки резерва мата.

Для определения резерва мата (максимального времени использования мата) определяют $КТ_{50}$ для комаров и мух (по приведенному выше методу) используя маты, которые уже нагревались

до опыта 1, 2, 3, 4, 5 и более часов. Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ (графически или по формуле 22) и статистическую ошибку. За резерв мата принимается максимальное время нагрева мата в часах, при котором $КТ_{50}$ составляет не более 7 мин. для комаров и 9-20 мин. для мух в зависимости от изучаемого действующего вещества.

Жидкостные электрофумигаторы.

Метод определения $КТ_{50}$.

Электрофумигатор включают в электрическую сеть согласно инструкции и через 60 мин. помещают его в камеру с комарами (мухами) так же, как описано выше для электрофумигаторов с матами. Определяют $КТ_{50}$, мин. как описано выше. Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ (графически или по формуле 22) и статистическую ошибку.

Метод оценки резерва жидкости во флаконе.

Для определения резерва жидкости во флаконе (максимального времени использования жидкости во флаконе) определяют количество испарившейся жидкости после непрерывной работы электрофумигатора в течение не менее 8 часов. Этот процесс должен быть повторен не менее 3-5 раз. Каждый раз флакон взвешивают до и после эксплуатации, фиксируется время работы, Δ массы флакона. На основании этих данных рассчитывают количество вышедшего в воздух содержимого флакона, мг/час, и далее резерв флакона в часах путем деления массы нетто флакона в мг на количество вышедшего в воздух в мг/час.

Электрофумигаторы с таблеткой.

В качестве носителя ДВ используется таблетка из технопеска в пластиковой оправе, которая применяется с электронагревательным устройством определенного типа. В пластиковую оправу вмонтирован

индикатор (с подкрашенной жидкостью). Когда жидкость в индикаторе полностью испаряется, это сигнал к тому, что все ДВ вышло в воздух, и средство свою работу завершило.

Метод определения $КТ_{50}$.

Нагревательное устройство включают в электрическую сеть согласно инструкции за 15 мин. до начала опыта без таблетки. Таблетку вставляют в нагревательное устройство и сразу размещают в камере с комарами. Определяют $КТ_{50}$, мин. как описано выше. Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ (графически или по формуле 22) и статистическую ошибку.

Метод оценки резерва таблетки.

Для определения резерва таблетки (максимального времени использования таблетки) определяют $КТ_{50}$ для комаров и мух (по приведенному выше методу) используя таблетки, которые уже нагревались до опыта в течение определенного времени. Опыт повторяют три раза. Рассчитывают среднее значение $КТ_{50}$ (графически или по формуле 22) и статистическую ошибку.

Показатели эффективности:

а) с матами (пластинами): $КТ_{50}$ для комаров не более 7 мин.; резерв мата для комаров не менее 7 часов;

б) жидкостные: $КТ_{50}$ для комаров не более 4-5 мин.; резерв средства для комаров не менее указанного в НТД; $КТ_{50}$ для мух не более 9-12 мин. (при использовании вапортрина) и 20 мин. (при использовании других летучих пиретроидов); резерв средства для мух не менее указанного в НТД;

в) с таблеткой: $КТ_{50}$ для комаров не более 15 мин.; $КТ_{50}$ для мух не более 45 мин. (при использовании трансфлутрина); резерв средства для комаров (мух) не менее указанного в НТД

Метод оценки возможности применения концентратов эмульсии и средств в аэрозольной или беспропеллентной упаковке для обработки растительности (мест дневок комаров в природе).

Для изучения эффективности используют накормленных кровью самок (1-2 суток после кормления на мышах) комаров Ae. aegypti (или др.) лабораторного разведения.

В невысокой лабораторной посуде (чашке Петри) проращивают пшеницу или другой злак до достижения побегами длины 15 см, после чего растения опрыскивают изучаемым средством, высушивают в течение 1 часа и помещают «газон» в камеру 0,5 $м^3$ с имаго комаров. В контрольную камеру помещают необработанную траву. Учеты пораженных насекомых проводят с интервалом 5-15 мин. до полной гибели насекомых.

Показатели эффективности: 100% гибель комаров при учете через 1 час.

2.3.4. Методы оценки активности средств борьбы с преимагинальными стадиями насекомых

Метод оценки активности средств борьбы с личинками комаров.

Оценку активности инсектицидов для личинок комаров проводят на личинках II-IV возраста желтолихорадочного комара Ae. aegypti или подвального комара Cx. pipiens molestus инсектарных культур.

В сосуды объемом 200-500 мл наливают по 100-400 мл водопроводной воды, отстоянной в течение 24 часов. В каждый сосуд (за 2 часа до опыта) помещают по 20 личинок II, III или начала IV возраста. Через 2 часа погибших или ослабленных личинок удаляют и заменяют на жизнеспособных. В сосуды добавляют 1 мл раствора (эмульсии, суспензии) инсектицида определенной концентрации.

Одновременно испытывают 4-5 концентраций, каждая в 3 повторностях. Контролем служат личинки, находившиеся в воде без добавления инсектицида. Параллельно ставят контроль с эталонным препаратом. В период эксперимента температура воды должна находиться в пределах 21-23°С. Подсчет погибших личинок проводят через 24 часа. Если более 10% личинок в контроле окуклилось, опыт не учитывают и повторяют.

Показатели эффективности: остаточное действие – гибель личинок при подсадке на 3 сутки через 24 или 72 часа 100%;

а) микробиологические $СК_{50}$, мг/л – не более приведенной в ТУ;

б) на основе уротропина и др. – гибель личинок через 24 часа 100%;

в) ФОС, пиретроиды и др. – гибель личинок через 24 часа 100%; длительность остаточного действия 3-15 суток.

Метод обработки инсектицидами субстрата с личинками комнатных мух.

В сосуд объемом 0,5 л с 200 г влажных отрубей помещают на поверхность субстрата 30 личинок III возраста. Когда все личинки проникнут в субстрат (через 10-15 мин.), из распылителя равномерно орошают поверхность 10 мл раствора (эмульсии, суспензии) инсектицида, что соответствует 2 л/м^2 рабочей жидкости. Сосуды закрывают бязевыми салфетками, которые закрепляют резинками.

В каждом опыте используют 5 концентраций инсектицида в 3 повторностях. Учет результатов проводят через 48 часов, подсчитывая число личинок, погибших в 3 сосудах, а в 3 сосудах личинок оставляют в субстрате до окончания метаморфоза. Эффективность обработки определяют по процентному соотношению числа погибших личинок и выплодившихся имаго в контроле и опыте.

Определяют концентрацию, обеспечивающую 50, 95 и 99% гибели личинок (формула 3).

Метод обработки субстрата инсектицидами до подсадки личинок.

Влажные отруби обрабатывают раствором (эмульсией, суспензией) инсектицида из расчета 50 мл на 1 кг субстрата и тщательно перемешивают. В каждые 200 г обработанного субстрата подсаживают 30 личинок III возраста. В каждом опыте используют 4 концентрации инсектицида в 3 повторностях. Учет результатов проводят через 24 и 48 часов после постановки опыта. Оставшихся в живых личинок пересаживают через 2 суток в необработанные отруби и наблюдают за циклом метаморфоза – подсчитывают число куколок и выплодившихся имаго. Эффективность обработки определяют по соотношению числа личинок и выплодившихся имаго в контроле и опыте (формула 3). При подсчете результатов опытов рассчитывают дозу по ДВ на 1 кг субстрата.

Метод изучения действия инсектицидов на куколок мух.

По 10-20 куколок комнатных мух помещают на дно стеклянных сосудов и засыпают слоем песка высотой 6-7 см, затем с помощью распылителя обрабатывают песок водными эмульсиями (растворами, суспензиями) препарата из расчета 1 л раствора на 1 $м^2$. Обработку проводят 5-7 концентрациями препарата, каждый опыт ставят в 3 повторностях. Сосуды с куколками обвязывают марлевыми салфетками либо ставят открытыми в марлевый (сетчатый садок). Подсчет выплодившихся мух проводят через 2-3-5 суток после обработки. Одновременно ставят контроль – сосуды с куколками, обработанными растворителем (водой). Эффективность препарата определяют по процентному соотношению числа мух, выплодившихся в

контроле и опыте (формула 3). Определяют концентрации, обеспечивающие 50, 95 или 99% гибели мух.

2.3.5. Методы определения овицидных свойств инсектицидов

Метод изучения действия инсектицидов на яйца мух.

При определении овицидности веществ или средств для яиц мух можно использовать разные методы. При первом методе кладки яиц мух по 20 мг заворачивают в батистовую салфетку и погружают в раствор инсектицида, затем тщательно прополаскивают в проточной воде. Часть оставляют на влажной фильтровальной бумаге для наблюдения, а часть переносят в питательный субстрат. В контрольном варианте яйца погружают в воду. Учет проводят через 48 часов.

При втором методе 20 мг яиц комнатных мух помещают на влажные отруби в 0,5-литровые сосуды. Для приготовления влажных отрубей берут на 100 г прокаленных 200 г воды и тщательно перемешивают. В каждый сосуд помещают 200 г влажных отрубей, поверхность субстрата с яйцекладками равномерно орошают 10 мл раствора (эмульсии, суспензии) инсектицида, что соответствует норме расхода рабочей жидкости 1 л/м^2. Дозу препарата рассчитывают по ДВ на 1 кг субстрата. Опыты ставят одновременно не менее чем в 5 дозах, каждая в 3 повторностях. В контрольном варианте яйцекладки орошают водой или растворителем. После орошения яйцекладки засыпают тонким слоем (1,0-1,5 см) влажных отрубей, чтобы предотвратить их высыхание. Сосуды завязывают салфетками из бязи. Учет результатов проводят через 48 часов, подсчитывая число личинок, выплодившихся из контрольных и обработанных яйцекладок. Эффективность препарата устанавливают по соотношению числа личинок в обработанном и

контрольном субстрате. Определяют дозу, обеспечивающую 50 и 99% гибели яиц.

При третьем методе на пластинки черной бумаги 1×1 см, слегка смоченные молоком или белком куриных яиц, кисточкой или препаровальной иглой наносят по 20 жизнеспособных яиц. Пластинки с яйцами погружают на 3 сек. в спиртовые или водные рабочие растворы средств или действующих веществ; контрольные – в чистый спирт или воду, подсушивают на фильтровальной бумаге и переносят в чашки Конвея, в которых круговые емкости заполнены водой для поддержания 100%-ной влажности. Для нахождения величин $СК_{50}$ и $СК_{95}$ используют не менее 5-6 концентраций в 5-7-кратной повторности.

Метод изучения действия инсектицидов на яйца клопов.

Яйцекладки 3-5 дневного возраста, помещенные на листы фильтровальной бумаги размером 30 $см^2$ орошают 0,3 мл раствора (эмульсии, суспензии) инсектицида. Каждый инсектицид испытывают не менее чем в 5 концентрациях, в трех повторностях каждая. Дозу инсектицида по ДВ рассчитывают в граммах на 1 $м^2$ обработанной поверхности. В контроле яйцекладки обрабатывают водой или растворителем. После обработки яйцекладки переносят в стеклянные стаканы и сверху покрывают нарезанной фильтровальной бумагой. Учет результатов проводят через 5-7 суток. Эффективность препарата определяют по соотношению числа личинок, вылупившихся из обработанных и контрольных яйцекладок. Определяют дозу, обеспечивающую 50, 95 и 99% гибели яиц.

Метод изучения действия инсектицидов на яйца блох.

На дно трехлитрового сосуда кладут листы черной бумаги, так чтобы она полностью покрывала дно сосуда, и помещают туда белую мышь в сетчатой клетке. На зверька выпускают 100 самок и 25 самцов

блох. Листы бумаги меняют ежедневно и подсчитывают количество отложенных на них яиц. Из листа, на котором отложены яйца блох, вырезают листки размером 4×5 см и обрабатывают каждый 0,2 мл раствора (эмульсии) инсектицида. Опыты ставят в 5 концентрациях, в трех повторностях каждая. В контрольном варианте лист бумаги обрабатывают растворителем. Опыты с яйцекладками насекомых проводят при температуре воздуха в помещении – 23-27°С. Учет результатов проводят через 4-6 суток. Эффективность обработки определяют по соотношению числа личинок, выплодившихся на обработанном и контрольном листах. Определяют концентрацию, обеспечивающую 50, 95 и 99% гибели яиц.

2.3.6. Методы оценки активности педикулицидных средств

В опытах используют имаго и личинок III возраста платяных вшей (Pediculus humanus humanus L., 1758) лабораторной чувствительной культуры или из природных популяций, собранных с одежды зараженных вшами людей, обратившихся в санпропускник. В случае необходимости проведения экспериментов на головных вшах Pediculus humanus capitis DeGeer используют насекомых, собранных с людей.

В случае использования лабораторной чувствительной культуры в опытах используют сытых вшей. Подопытных вшей содержат в термостате при температуре 28±2°С и относительной влажности 70-76%.

В случае использования вшей из природных популяций опыты должны быть поставлены в день сбора насекомых. Вшей собирают в стеклянные энтомологические пробирки (высотой не менее 50 мм, диаметром на менее 10 мм) по 20-30 особей в каждую. Вшей, собранных с одного человека, рассматривают как одну микропопуляцию и

пробирки с ними маркируют одним порядковым номером. Во время доставки пробирки везут вертикально, чтобы не допустить расползания вшей. В холодное время года насекомых в лабораторию необходимо доставлять в сумке-холодильнике с помещенными внутрь емкостями с горячей водой, чтобы не допустить переохлаждения вшей.

Для стандартизации биологического материала каждая микропопуляция вшей должна быть охарактеризована с точки зрения их чувствительности к пиретроидам (перметрину) и ФОС (малатиону) в диагностических концентрациях. При небольшом количестве собранных насекомых допустимо использовать в экспериментах смесь вшей из разных микропопуляций, с обязательным определением чувствительности насекомых (из смешанных микропопуляций) к перметрину и малатиону.

Метод определения доли устойчивых к инсектицидам особей вшей.

Для опытов используют стандартные фильтры диаметром 11 см или вырезают круг диаметром 11 см из фильтровальной бумаги. На фильтр, предварительно написав на нем карандашом название инсектицида, пипеткой равномерно наносят ацетоновый раствор инсектицида в норме расхода 1 мл/дм^2 (0,95 мл на стандартный фильтр диаметром 11 см) в диагностической концентрации (перметрин – 0,206%, малатион – 2,02% в пересчете на 100% действующее вещество), затем его высушивают в подвешенном состоянии до полного испарения ацетона. После этого фильтр вкладывают внутрь крышки от чашки Петри (диаметр 10 см), чтобы он плотно прилегал к дну, и высыпают на него вшей. Чтобы насекомые не расползлись, их накрывают оставшейся половиной чашки Петри, записывая на ней порядковый номер пробирки со вшами и время начала эксперимента. Через 6 часов чашку

переворачивают и слегка постукивают ею по столу. Вшей, которые не могут держаться на поверхности бумаги, считают парализованными (в состоянии нокдауна). Доля оставшихся на бумаге активных особей от общего числа насекомых, помещенных в чашку Петри изначально, отражает долю вшей, устойчивых к инсектициду, которым была обработана фильтровальная бумага. Опыты по определению устойчивости вшей к перметрину и малатиону проводят параллельно с изучением педикулицидной активности средств.

При изучении эффективности инсектицидов используют методы погружения насекомых и яиц или контактирования их с обработанными поверхностями. Опыт проводят не менее трех раз, в каждом опыте не менее трех повторностей. Контролем являются насекомые и яйца, подвергающиеся воздействию растворителя, и насекомые и яйца, не подвергающиеся воздействию средства и растворителя (биоконтроль). После контакта с педикулицидом подопытных вшей содержат в чашках Петри на чистых образцах бязи 5×5 см или в пенициллиновых флаконах с кусочками бязи 1×1 см в термостате при температуре 28±2°С и относительной влажности воздуха 70-76%. Учеты погибших в опыте платяных вшей проводят через 24 часа, головных – через 6 часов. Учеты гибели яиц (овоцидное действие) проводят еженедельно в течение 21 суток. Если в контроле погибло более от 5 до 20% насекомых или яиц вшей, данные опыта пересчитывают по формуле Аббота (формула 4). При гибели в контроле более 20% особей опыт не учитывают и повторяют.

Метод погружения имаго, личинок и яиц вшей для оценки инсектицидной, ларвицидной и овицидной активностей педикулицидных средств.

Приготавливают рабочие жидкости (водные эмульсии, суспензии, мыла и др.) или же используют готовые для применения формы (шампуни, лосьоны и др.). Насекомых (личинок III возраста, как наиболее устойчивых к инсектицидам, имаго) по 20 особей и яйца, помещают в бязевые салфетки 5×5 см и погружают в рабочие жидкости средства на разные сроки (от 10 мин. и более), чтобы определить необходимую экспозицию.

При оценке средств, предназначенных для борьбы с головным педикулезом, пряди волос с находящимися на них головными вшами (или полиамидные волокна с платяными вшами) погружают в рабочие растворы или готовые к применению жидкие средства. Продолжительность контакта от 1 до 60 мин. (и более).

По окончании экспозиции насекомых промывают теплой водой с мылом или шампунем для мытья волос и повторно теплой водой, просушивают на фильтровальной бумаге и переносят в чашки Петри на чистые образцы бязи 5×5 см и помещают в термостат при температуре 28±2°С.

Метод контактирования вшей с обработанными поверхностями для изучения инсектицидной и ларвицидной активностей педикулицидных средств.

При оценке средств, предназначенных для борьбы с платяным педикулезом, образцы бязи размером 10×10 см обрабатывают средством (эмульсией, раствором, суспензией, дустом). Жидкие формы используют из расчета 100 мл/м^2, дуст равномерно распределяют по поверхности ткани в норме расхода 10 г/м^2. Образцы бязи,

обработанные жидким средством, после высыхания помещают в чашки Петри и на них подсаживают не менее 20 особей платяных вшей (имаго и личинок III возраста). Срок контакта насекомых со средством составляет от 5 до 60 мин. в зависимости от назначения эксперимента. Затем вшей переносят в чашки Петри на чистые образцы бязи 5×5 см или в пенициллиновые флаконы с кусочками бязи 1×1 см и помещают в термостат при температуре 28±2°С.

При установлении эффективности педикулицидных мазей или гелей их с помощью кисточки наносят на поверхность ткани размером 10×10 см подсаживают насекомых на период от 1 до 60 мин. Для определения овицидной активности препарат наносят на кусочки ткани с отложенными яйцами вшей. Норма расхода препарата 1-5 г/100 $см^2$. После воздействия мази на вазелиновой основе или геля насекомых или их яйца промывают теплой водой с добавлением мыла или шампуня для мытья волос.

Метод оценки активности педикулицидных средств в аэрозольных или беспропеллентных упаковках.

Ткани с подсаженными на них насекомыми (имаго и личинки III возраста), а также яйцекладками, орошают струей аэрозоля, направляя ее с высоты 10-20 см под углом 45°С. Норма расхода средства составляет 20 г/$м^2$. Количество нанесенного средства определяют по разности веса баллона до и после выпуска смеси и далее рассчитывают расход действующего вещества, исходя из состава содержимого упаковки. После орошения тканей через 10 мин. подопытных насекомых пересаживают в чистые чашки Петри на чистые кусочки бязи размером 5×5 см и помещают в термостат для наблюдения. Учеты гибели платяных вшей ведут через 5, 10, 15, 30 мин. и 1-5 и 24 часа, головных – до 6 час.

Метод оценки эффективности импрегнированных тканей с целью профилактики платяного педикулеза.

Импрегнирование образцов тканей.

Для оценки инсектицидной активности средств, предназначенных для импрегнации ткани с целью профилактики платяного педикулеза, готовят образцы тканей размером 10×10 см. Образцы вырезают из влагоемкой ткани – хлопчатобумажного (х/б) трикотажа и не влагоемкой – х/б бязи. Количество образцов каждого типа ткани определяется числом концентраций инсектицида в эксперименте (не менее 2-3 концентраций в трех повторностях на двух видах тканей). При изучении нового действующего вещества (ДВ) или смесей ДВ в опытах используют не менее 3 концентраций инсектицида. Образцы ткани погружают в свежеприготовленные жидкости в рабочих концентрациях (водные эмульсии, суспензии, растворы). Жидкость с образцами тщательно перемешивают руками в резиновых перчатках, периодически сжимая ткань для лучшей пропитки. Объем рабочего раствора инсектицида зависит от числа образцов и вида тканей и составляет в среднем 300-500 мл. После полного пропитывания образцов (5 мин.) их извлекают из рабочих жидкостей, отжимают и просушивают.

После полного высыхания ткани часть обработанных образцов (по 3 образца для каждой концентрации инсектицида) используют для определения острого и остаточного (при хранении) инсектицидного действия. При определении периода хранения импрегнированного белья образцы сохраняют в полиэтиленовых или крафт-пакетах при комнатной температуре.

Метод изучения скорости поражения вшей при контакте с импрегнированной тканью.

На просушенные образцы ткани помещают экспозиметры Набокова и подсаживают не менее 10 вшей (имаго и личинок III возраста) в каждый. Признаки отравления насекомых регистрируют каждые 15-30 мин. При поражении (обездвиживании) всех особей в эксперименте контакт прекращают и вшей переносят в чашки Петри на чистые куски бязи размером 5×5 см или в пенициллиновые флаконы с вложенной тканью 1х1 см. Эти чашки помещают в эксикаторы с насыщенным раствором поваренной соли (относительная влажность воздуха около 75%) и убирают их в термостат (температура 28±2ºС). Учет гибели платяных вшей проводят через 24 часа. Все опыты проводят в трехкратной повторности. Все эксперименты сопровождают контрольными вариантами, в которых вшей подсаживают на необработанные образцы ткани.

Если при контакте с обработанными тканями в течение 180 мин. остаются активные (способные к передвижению) особи, то средство в данной концентрации считают неэффективным и эксперимент прекращают.

Если при контакте в течение 180 мин. с обработанными тканями все насекомые потеряли двигательную активность, но при учете через 24 часа остались живые вши (даже одна особь), средство в данной концентрации считают неэффективным.

Метод определения острого инсектицидного действия ткани, импрегнированной педикулицидными средствами.

В экспозиметры Набокова помещают вшей по 20-30 особей в каждый. Экспозиция составляет на 60 мин. Затем вшей переносят в чашки Петри на чистые куски бязи размером 5×5 см или в

пенициллиновые флаконы с вложенной тканью 1х1 см. Эти чашки помещают в эксикаторы с насыщенным раствором поваренной соли (относительная влажность воздуха около 75%) и убирают их в термостат (температура 28±2ºС). Учет гибели платяных вшей проводят через 24 часа. Все опыты проводят в трехкратной повторности. Все эксперименты сопровождают контрольными вариантами, в которых вшей подсаживают на необработанные образцы ткани.

Если после контакта 60 мин. с обработанными тканями при учете через 24 часа остались живые вши (даже одна особь), средство в данной концентрации считают неэффективным.

Для установления длительности остаточного педикулицидного действия импрегнированной ткани при хранении оценку ее инсектицидных свойств проводят каждые 7-10 дней в течение месяца. Для установления остаточного педикулицидного действия импрегнированной одежды при ношении образцы бязи и трикотажа, обработанные инсектицидом в выбранной концентрации, подшивают к белью и одежде добровольцев в количестве, которое определяется длительностью эксперимента. Через 3, 5 и/или 7 суток с одежды добровольцев спарывают по 3 образца бязи и трикотажа в выбранной концентрации инсектицида и контроль. На них подсаживают насекомых и оценивают динамику отравления и острое действие. После изучения эффективности образца (подсадки вшей) его изымают из эксперимента, не подшивая опять к одежде. Последний опыт проводят в сроки, соответствующие максимальному периоду непрерывного ношения одежды из импрегнированной ткани, разрешенному специалистами-токсикологами для каждого конкретного средства.

Показатели эффективности:

а) средства для лечения головного педикулеза (лосьоны, шампуни, мыла и другие моющие средства, дусты, кремы, гели, концентраты эмульсий) и платяного педикулеза (концентраты эмульсий): гибель имаго платяных вшей через 24 часа 100%, гибель яиц через 21 день 10-100%;

б) средств для импрегнации белья с целью профилактики платяного педикулеза: острое действие – гибель имаго и личинок III возраста платяных вшей при 60 мин. экспозиции на импрегнированной ткани (учет через 24 часа) – 100%.; время прекращения двигательной активности у 100% особей во время контакта с импрегнированной инсектицидом тканью – не более 180 мин.; длительность остаточного действия при ношении – не менее 3-7 суток.

2.3.7. Методы оценки активности средств борьбы с насекомыми-кератофагами

Оценку эффективности проводят на лабораторных культурах имаго и гусеницах платяной моли T. bisselliella и имаго и личинках кожееда A. smirnovi. Средства для борьбы с насекомыми-кератофагами подразделяются на неспецифические и специфические.

К неспецифическим средствам для борьбы с бабочками моли относятся средства в аэрозольной и беспропеллентной аэрозольной упаковке. Для опытов используют 1-2-дневных бабочек моли. Опыты проводят в стеклянных камерах объемом 2 $м^3$, или используют модификацию метода, согласно которой испытания проводят в платяных шкафах, объемом примерно 1 $м^3$, в которые запускают по 50 бабочек моли и распыляют средство из расчета 1 $г/м^3$. Учет гибели проводят через 15 мин. и через 24 часа, учитывая количество живых, мертвых и парализованных бабочек.

К неспецифическим средствам борьбы с личинками кожеедов относятся средства контактного типа действия, предназначенные для уничтожения комплекса нелетающих насекомых. Оценку эффективности указанных средств проводят в отношении личинок кожееда 11-12-недельного возраста методом 15-минутного принудительного контакта с обработанной соответствующим средством поверхностью.

Метод изучения инсектицидной и овицидной активности специфических средств контактного типа действия.

Острое действие определяют при непосредственном орошении средством 28-30-дневных гусениц моли или 11-12-ти недельных личинок кожееда на пищевом субстрате – неаппретированном сукне (артикул 3907), а также методом контакта насекомых с поверхностью указанной ткани размером 10×10 см, обработанной средством, исходя из нормы расхода 10-20 г/см^2 (до легкого увлажнения). В качестве контроля используют аналогичные образцы, обработанные только основным растворителем, присутствующим в средстве. Обработанные образцы высушивают в течение 24 часов при комнатной температуре, помещают на них по 10 гусениц моли или личинок кожееда и накрывают крышкой от чашки Петри. Учет опытов проводят ежедневно в течение 72 часов. Опыты проводят в 3 повторностях при температуре 23±1ºС.

Аналогично оценивают продолжительность действия средства, подсаживая насекомых ежемесячно (или при необходимости через более короткие промежутки времени) на эти же обработанные образцы сукна.

Для средств, которые не содержат традиционных инсектицидов, обладают невысоким или непродолжительным действием, в том числе

при снижении инсектицидной активности после хранения в течение нескольких месяцев, аналогичным методом оценивают молезащитное (антифидантное) действие средства. При этом высушенные образцы ткани размером 4×4 см взвешивают с точностью до четвертого знака, помещают на них по 10 гусениц моли строго указанного выше возраста, затем образцы ткани вместе с насекомыми переносят в стеклянные стаканчики диаметром 3,5 см, высотой 6 см, которые сверху закрывают бязью.

Продолжительность опыта составляет 14 суток, после чего визуально проводят определение количества погрызов и оценивают повреждение ткани в баллах и взвешивают ткань с точностью до четвертого знака, определяя количество ткани, съеденной 10 гусеницами моли.

Аналогично проводят оценку антифидантного действия в отношении личинок кожееда, но при этом с поверхности субстрата и со дна стаканчика кисточкой собирают все экскременты и также взвешивают с точностью до четвертого знака.

Определение остаточного действия на ткани или мехе методом ускоренного старения. Хранение образцов обработанного шерстяного сукна и мехового полуфабриката каракуля проводят в закрытых бумажных конвертах при повышенной температуре (40°С) в термостате (ускоренное старение).

Расчет продолжительности действия средства при ускоренном старении рассчитывают согласно «Временной инструкции И-42-2-82 по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств» на основе метода ускоренного старения» по формулам 24, 25 и 26.

Метод изучения инсектицидной и овицидной активности специфических средств фумигационного типа действия.

Оценку острого действия средств в отношении гусениц моли проводят в экспериментальных емкостях объемом 0,01-0,5 $м^3$ или платяных шкафах объемах 0,6-1 $м^3$.

В емкости помещают сукно (артикул 3907), размещают средство требуемым образом, вносят по 20 бабочек моли (в садках размером 10×10 см, либо в случае небольших емкостей, предназначенных для оценки средств в виде небольших пластин, в садках меньшего размера), по 30 гусениц на пищевом субстрате (сукне размером 10×10 см), вложенном в полотняный мешочек объемом 300 $см^3$, и по 100 яиц на таком же субстрате. Опыты проводят в 3 повторностях при температуре 23±1ºС. Определение эффективности средств в отношении имаго и личинок кожееда проводят в аналогичных емкостях, помещая насекомых на пищевой субстрат и затем в полотняный мешочек.

Учет гибели бабочек моли в зависимости от применяемого действующего вещества проводят через 24-72 часа, имаго и личинок кожеедов – через 72 часа, яиц – через 10 суток. Гибель гусениц оценивают ежедневно в течение 3 суток, при отсутствии гибели или невысоком уровне смертности через 14 суток оценивают молезащитное действие.

Аналогично проводят изучение продолжительности действия средства, при этом не заменяют средство и развешенное сукно и через определенные промежутки времени в экспериментальные емкости вносят насекомых.

Метод изучения инсектицидной активности средств фумигационного типа действия на модельном объекте.

Пропитанные инсектицидами картонные пластины помещают в среднюю часть стеклянных сосудов объемом 10 л. В сосуды помещают поилки для насекомых (небольшой пластмассовый контейнер с влажной ватой). Комнатных мух (имаго 3-6-дневного возраста, без разделения по полу по 100-150 шт.) выпускают в сосуды, закрывают их бязью, и фиксируют время наступления паралича с интервалом 5-15 мин. в течение 1 часа и далее каждые 30 мин. в течение 6-7 часов. После поражения 95% насекомых в опыте пластины извлекают из сосуда и через 24 часа учитывают долю оставшихся в живых особей. Оценку фумигационной активности инсектицидов проводят путем сравнения показателей – $КТ_{50}$ и $КТ_{95}$ – времени (мин или час), за которое 50% (95%) насекомых в эксперименте находятся в состоянии нокдауна и показателя характеризующего обратимость состояния паралича – доли оставшихся в живых особей при учете через 24 часа. Повторность опытов трехкратная. Опыты проводят при постоянной температуре воздуха (23-25°С).

Показатели эффективности: острое действие: нокдаун 95% особей в течение 3-6 часов; смертность при учете через 24 часа не менее 80%.

Метод оценки активности средств репеллентного типа действия.

Предварительную оценку репеллентного действия проводят в ольфактометре, который представляет собой ящик из оргстекла объемом 0,04 $м^3$, разделенный перегородкой на отсеки-ловушки. В опытную ловушку помещают в качестве привлекательного пищевого субстрата сукно артикула 3907, на которое наносят средство (исходя из нормы расхода, составляющей 1/25 от нормы, необходимой для внесения в емкость объемом 1 $м^3$), а в контрольную ловушку помещают

только указанный пищевой субстрат. Опыты проводят в 3 повторностях при температуре 23±1ºС. В ольфактометр запускают по 50 бабочек моли (1-2-дневного возраста) и через 24 часа проводят оценку репеллентного действия, критерием которого является количество бабочек моли и количество отложенных на субстрат яиц в опытном и контрольном отсеке. Коэффициент отпугивающего действия (КОД) отдельно для бабочек и яиц моли рассчитывают по формуле 12.

Для проведения испытаний в условиях, приближенных к натурным, используют платяные шкафы или другие замкнутые емкости объемом 0,5-1,0 $м^3$, в которых размещают требуемое количество средства. Опытные и контрольные шкафы заполоняют в качестве имитации одежды 1,5-2 $м^2$ неаппретированного сукна артикула 3907. Во все экспериментальные объемы запускают по 50 бабочек моли 1-2-дневного возраста. Через 24 часа проводят осмотр шкафов и коробов и развешенного в них сукна. При осмотре учитывают количество живых бабочек на сукне и количество отложенных ими яиц. Рассчитывают величину КОД. Для определения продолжительности действия средства бабочек запускают в экспериментальные емкости через фиксированные промежутки времени, не заменяя в них средство и сукно.

Показатели эффективности:

а) средства контактного действия: острое действие – гибель гусениц моли или личинок кожеедов через 72 часа 100%; длительность остаточного действия – 4-6 месяцев, изъеденность ткани в течение 14 суток – не более 7 мг;

б) средства фумигационного действия: острое действие – гибель имаго через 48 часов 100%; длительность остаточного действия – не менее 4 месяцев;

в) средства репеллентного действия: КОД в ольфактометре через 24 часа – не менее 75%; длительность остаточного действия – 1-4 месяцев.

2.3.8. Методы оценки инсектицидной активности средств для уничтожения ос

Метод оценки активности инсектицидных средств в аэрозольной упаковке для борьбы с осами в помещении (при распылении в воздух).

Оценка активности инсектицидных средств в аэрозольной упаковке проводится в лабораторных условиях на модельном объекте – имаго комнатных мух инсектарной культуры. В камеру объемом 2 $м^3$ выпускают 300 мух. Во время проведения эксперимента температуру воздуха поддерживают в интервале 22±2ºС, чтобы избежать излишне возбуждающего или угнетающего влияния температуры на насекомых; относительную влажность поддерживают в пределах 50-70%. При изучении каждого варианта рецептуры средства эксперимент повторяют пятикратно. Струю аэрозоля направляют в камеру, при этом расход средства не должен превышать 1 $г/м^3$. Расход средства контролируется взвешиванием аэрозольной упаковки до и после выпуска содержимого. При помощи секундомера определяют время (Т) поражения 99% насекомых в минутах и рассчитывают величины $С_{15}$ (мг/м3) – величина концентрации инсектицида в воздухе, которая вызывает поражение 99% насекомых за 15 мин., Q_{15} ($мг/м^3$) – количество содержимого аэрозольной упаковки, выпущенное из баллона, вызывающее поражение 99% насекомых за 15 мин., и величину $КТ_{50}$ (в мин.) (формулы 16, 17, 18, 22).

Метод оценки активности инсектицидных средств, применяемых способом орошения, для борьбы с осами в гнездах.

Оценку активности инсектицидных средств для обработки гнезд ос проводят на имитациях (моделях) гнезд ос и на впитывающих поверхностях различного типа в лабораторных условиях, используя в качестве модельных объектов мух и рыжих тараканов. В летний период эксперимент можно провести в натурных условиях непосредственно на осах в гнездах.

а) Оценка активности инсектицидных средств в специальной аэрозольной упаковке на моделях гнезд.

В летний период собирают опустевшие осиные гнезда или же изготавливают имитации гнезд из пяти слоев папиросной бумаги или фильтровальной бумаги в 2 слоя, напоминающие по форме осиные гнезда, диаметром примерно 10 см. Внутрь гнезда помещают по 100 имаго комнатных мух лабораторной культуры без разделения по полу, входной отверстие закрывают марлей. Модели гнезд прикрепляют клейкой лентой (скотчем) к стене на высоте 1,5 м от уровня пола в помещении объемом 10-15 $м^3$. Обработку гнезд проводят с расстояния 1,5-2 м при нормах расхода 20-40 $г/м^2$, что соответствует распылению в течение 1-3 сек. в зависимости от типа распылительного устройства и скорости эвакуации жидкости из упаковки. Струю жидкости стараются направить в отверстие модели гнезда. Сразу после обработки испытатель должен покинуть помещение на 30 мин. Затем помещение проветривают, обработанные гнезда помещают в марлевые садки и проводят учет гибели мух через 1 ч и 24 ч.

б) Оценка продолжительности остаточного действия на поверхностях различного типа инсектицидных средств, применяемых способом орошения, для борьбы с осами.

В том случае, если гнездо расположено в полости стен, крыши и т.д., его не видно снаружи, и до него трудно добраться, рекомендуется обработать инсектицидом поверхность вокруг щелей (трещин), через которые осы проникают внутрь строения и вылетают обратно.

В камеру для опрыскиваний помещают различные тест-поверхности: натуральный материал осиных гнезд размером 10×10 см, который раскладывают в чашки Петри; фанеру, шифер размером 10×20 см, картон или бумагу – 10×10 см. Тест-поверхности орошают средством из аэрозольной упаковки с расстояния 20 см под углом 45º при норме расхода 20 г/м^2 (либо рабочей водной эмульсией средства при норме расхода 100-150 г/м^2). Через 15 мин. тест-поверхности удаляют из камеры и на них подсаживают имаго мух (на 5 мин.) или рыжих тараканов (на 15 мин.), используя стандартные экспозиметры Набокова-Ларюхина (D=4 см). Затем насекомых переносят в сухие чистые пластиковые стаканы, которые закрывают марлей (мухи) или пластиковыми крышками с отверстиями для аэрации (тараканы). Учеты гибели ведут через 15 мин. и 24 ч.

Для оценки продолжительности остаточного действия тест-поверхности следует хранить при комнатной температуре и периодически (через 2, 3, 5 суток) подсаживать на них мух и тараканов описанным выше способом. Учеты гибели следует вести через 24 ч. Если количество погибших насекомых через 24 ч не превышает 50%, исследование остаточного действия считают законченным.

Метод оценки активности неспецифических инсектицидных приманок для борьбы с осами в помещении.

В лабораторных условиях при оценке неспецифических инсектицидных приманок для уничтожения ос в качестве тест-объекта используют имаго комнатных мух. При необходимости исследования

специфических приманок для ос эксперименты проводят в натурных условиях.

Показатели эффективности:

а) инсектицидные средства в аэрозольной упаковке для борьбы с осами в помещениях (при распылении в воздух): острое действие на ос (мух – тест-объект) C_{15} – не более 10 мг/м^3, Q_{15} – не более 1000 мг/м^3, $КТ_{50}$ – не более 7 мин.;

б) инсектицидные средства в специальной аэрозольной упаковке для обработки гнезд: острое действие на ос (мух – тест-объект) через 30 мин. после обработки моделей гнезд – не менее 90%, при подсадке мух (рыжих тараканов) на впитывающую тест-поверхность (через 15 мин. после обработки) – гибель не менее 100%; гибель через 24 ч – не менее 100%; длительность остаточного действия – не менее 3 суток;

б) инсектицидные средства, наносимые на поверхности в районе гнезда способом орошения: острое действие на ос (мух – тест-объект) при подсадке мух (рыжих тараканов) на впитывающую поверхность (через 15 мин. после обработки) – гибель не менее 100%; гибель через 24 ч – не менее 100%; длительность остаточного действия – не менее 3 суток;

в) неспецифические инсектицидные приманки: острое действие на ос (мух – тест-объект) – гибель через 24 ч не менее 80%, длительность остаточного действия – 10-30 суток.

2.4. Методы изучения эффективности акарицидных, инсектоакарицидных средств и тканей, содержащих инсектоакарициды

Оценка эффективности акарицидных и инсектоакарицидных средств должна быть проведена на активных нетравмированных самках вида (видов) клещей, в отношении которого (которых) будут даны

рекомендации по применению. Как правило, это виды, имеющие наибольшее эпидемиологическое значение на конкретной территории. Например, для территории стран Евразийского союза клещи рода Ixodes являются основными переносчиками возбудителей клещевого вирусного энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов и т.д. Исследования, в первую очередь, должны быть проведены на наиболее устойчивом к воздействию акарицидов виде клещей. Среди иксодовых клещей рода Ixodes – это таёжные клещи. При необходимости исследования проводят на нескольких видах клещей, отличающихся биологией, географическим распространением и чувствительностью к акарицидам. Дополнительно можно провести опыты на самцах. При наличии достаточного обоснования возможно распространение данных, полученных для наиболее устойчивого вида, на другие виды, обладающие аналогичной или меньшей устойчивостью к акарицидам. Поскольку есть данные о схожести биологии и экологии таёжного и лесного клещей и близкой чувствительности их к акарицидам, допустимо выводы, сделанные на основе исследований на I. persulcatus, распространять на I. ricinus. Однако для рекомендаций применения против клещей других родов (Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma) необходимы дополнительные исследования. Поскольку известно, что клещи рода Ixodes инсектарной культуры уступают по своей двигательной активности природной популяции, исследования следует проводить на клещах, собранных в природном биотопе. Предпочтительнее испытания проводить в период максимальной активности клещей в природе. Лабораторные условия очень существенно отличаются от природных биотопов, где будут применяться средства и защитная одежда, поэтому на основании лабораторных опытов можно делать только предварительные опыты, а

для окончательных выводов необходимо оценить эффективность средства и защитные свойства одежды в реальных условиях применения (природные биотопы) или провести практические испытания.

2.4.1. Метод изучения эффективности акарицидных и инсектоакарицидных средств, предназначенных для обработки природных биотопов с целью уничтожения иксодовых клещей

Оценку эффективности средств, предназначенных для борьбы с иксодовыми клещами в природных биотопах, осуществляют на основании исследований на экспериментальных площадках в природных биотопах (см. раздел 2.8.4).

2.4.2. Методы изучения эффективности акарицидных и инсектоакарицидных средств, предназначенных для обработки одежды с целью индивидуальной защиты людей от нападения иксодовых клещей, блох и других членистоногих

Метод изучения эффективности средств, предназначенных для защиты людей от нападения иксодовых клещей.

Такие акарицидные и инсектоакарицидные средства разрешают для обработки одежды, снаряжения. Они бывают представлены концентратами эмульсии, аэрозольными и беспропеллентными упаковками, а также специальными брусками (карандашами, мелками и т.д.).

Подготовительный этап.

Из белой хлопчатобумажной бязи изготавливают контрольный и 3 опытных теста в виде лент размером 70,0×10,0 см. Карандашом на каждом тесте делают отметки: 5 см от нижнего края теста (место подсадки клеща), 10 см от нижнего края (нулевая отметка – начало обработанной части теста) и далее через каждые 10 см до отметки 50 см.

Контрольный тест не должен соприкасаться с опытными тестами или руками, загрязненными инсектоакарицидами! Опытные тесты закрепляют на впитывающей поверхности (ткань, фильтровальная бумага и т. п.) размером 80,0×40,0 см, прикрыв полиэтиленом нижние 10 см тестов. Затем эту поверхность с тестами закрепляют вертикально и обрабатывают рабочим раствором концентрата эмульсии или аэрозолем в соответствии с рекомендуемой нормой расхода (обычно для аэрозольных и беспропеллентных аэрозольных упаковок – 20 г/м^2 поверхности). При оценке эффективности акарицидных брусков средством наносят полосы в соответствии с рекомендациями по применению на расстоянии 10 см от нижнего края теста. После обработки тесты открепляют, просушивают и развешивают в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности, освещенности. Испытания тестов начинают через 1 сутки после их подготовки.

Оценку эффективности средств, предназначенных для защиты людей от нападения иксодовых клещей-переносчиков возбудителей клещевого энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов проводят в лаборатории на самках таёжного клеща I. persulcatus природной популяции. Используют клещей, собранных с растительности не более чем за 1 сутки до проведения опытов и хранившихся во влажных бинтах при температуре от 10-15°С. Опыты проводят при температуре воздуха 22±2ºС и относительной влажности 60-80%. Тесты закрепляют под углом 70º к горизонту: используют специальное приспособление для закрепления теста или нижний конец теста закрепляют пластырем на столе, а верхний – на стене, примыкающей к столу.

Клещей по одному экземпляру помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани,

дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от хоботка (гнатосомы). Регистрируют время от момента пересечения клещом нулевой отметки до его отпадения с теста, что соответствует наступлению состояния паралича конечностей (нокдаун). Одновременно регистрируют максимальную высоту подъема каждого клеща от нулевой отметки. Отпавших клещей помещают в 70% раствор этилового спирта с целью их фиксации или в пробирку с высокой (около 90%) влажностью для проверки обратимости нокдауна. Нокдаун признают обратимым, если клещи способны удерживаться и ползти вверх по ткани через 15, 30, 60 мин. или 1 сутки после регистрации нокдауна. Опыт повторяют не менее чем с 10 самками на каждом из трех опытных тестов. Рассчитывают среднее значение времени наступления состояния нокдауна в минутах ($КТ_{ср}$), среднюю максимальную высоту подъема каждого клеща по тесту в сантиметрах ($МВ_{ср}$).

Между опытами тесты подвешивают в лаборатории при комнатной температуре 22±2ºС, относительной влажности 60-70% и естественном освещении.

Определение индекса скорости присасывания (ИСП) проводят по п. 2.2.5. Время контакта клещей с обработанной частью опытных тестов должно равняться ½ $КТ_{ср}$.

Для установления длительности защитного действия проводят повторные испытания до снижения показателей ниже нормативного. Частоту испытаний определяет испытательная лаборатория (центр). Длительность защитного действия и указания на обратимость нокдауна клещей приводят в эксплуатационной документации. Для средств, содержащих инсектоакарициды, после испытаний на самках таёжного клеща указывают назначение: для защиты от иксодовых

клещей-переносчиков возбудителей клещевого энцефалита и боррелиоза. Указание на переносчиков других инфекций (крымская геморрагическая лихорадка, риккетсиозы и т. д.) возможно только после испытаний на видах иксодовых клещей, являющихся основными переносчиками этих инфекций. В тексте этикетки (для быта) указывают: «Нарушение правил поведения и способа применения средства может привести к присасыванию клещей. Будьте внимательны!»

Показатели эффективности: $КТ_{ср}$ – не более 5 мин., $МВ_{ср}$ – не более 50 см, ИСП – не более 1,1.

Метод изучения эффективности инсектоакарицидных средств, предназначенных для защиты людей от нападения блох.

Исследования выполняют в лаборатории на голодных крысиных блохах Xenopsylla cheopis чувствительной инсектарной культуры. Опыты проводят при температуре воздуха 25±2ºС и относительной влажности 60-70%.

Подготовительный этап.

Из чистой белой хлопчатобумажной бязи изготавливают контрольный тест в виде полоски размером 50,0×1,5 см. Контрольный тест не должен соприкасаться с опытными тестами или руками, загрязненными инсектоакарицидами! Для изготовления опытных тестов ткань размером 60,0×10,0 см закрепляют на впитывающей поверхности (ткань, фильтровальная бумага и т. п.). Затем эту поверхность с тестом закрепляют вертикально и обрабатывают рабочим раствором концентрата эмульсии или аэрозолем в соответствии с рекомендуемой нормой расхода (обычно для аэрозольных и беспропеллентных аэрозольных упаковок – 20 г/м^2). После полного высыхания обработанной ткани (1 час) из разных её участков вырезают 3 опытных

теста в виде полосок размером 50,0×1,5 см. На полоски карандашом наносят отметки длины теста (5, 10, 15, 20 и т. д. см).

Оценку активности блох лабораторной культуры проводят непосредственно перед оценкой эффективности средства, используя контрольный тест.

К центру внутренней поверхности стеклянной крышки от чашки Петри (диаметр около 9 см) приклеивают крючок, к которому подвешивают контрольный тест. В стеклянный мерный цилиндр высотой 70 см и диаметром 8 см помещают 30 блох. Цилиндр ставят в центр таза с высокими бортами (не менее 20 см).

Закрывают крышкой цилиндр, помещая контрольный тест в центр цилиндра так, чтобы нижний край теста на 1 см не достигал дна. Включают секундомер. Блохи впрыгивают на контрольный тест, передвигаются по нему вверх и достигают крышки. Показателем достаточной активности блох инсектарной культуры является нахождение через 5 мин. на контрольном тесте и крышке более 90% блох, помещенных в цилиндр. После проверки активности блох собирают эксгаустером и уничтожают (кипятком, эфиром и т. п.). Таз служит дополнительной страховкой от рассеивания блох, поскольку из него блохи выбраться не могут.

Оценку эффективности средства начинают после опыта с контрольным тестом. В цилиндр помещают новую группу блох из 30 особей лабораторной культуры, затем вместо контрольного теста помещают в цилиндр первый опытный тест, включают секундомер и наблюдают за поведением блох. Блохи должны запрыгивать на опытный тест и отпадать с него на дно цилиндра в результате наступления состояния нокдауна (состояния паралича членистоногих, выражающегося для блох в невозможности подпрыгивать и ползти

вверх). Регистрируют количество блох, находящихся на тесте через 5 мин. после начала опыта ($КБ_5$) и высоту подъёма 3 блох, поднявшихся по тесту выше других особей (МВ). После окончания каждого опыта блох собирают эксгаустером и через воронку помещают в стеклянные пробирки для учета состояния насекомых (подвижность, смертность) через 15 мин., 1 час и 1 сутки после начала опыта. По этим результатам судят об обратимости нокдауна. Затем этих блох уничтожают. Каждый опыт проводят на 3 тестах и трех группах блох (повторности), рассчитывают средние показатели эффективности ($КБ_5$ – среднее количество блох на тесте через 5 мин. после начала опыта и $МВ_{ср}$ – средняя максимальная высота подъема блох).

Между опытами тесты подвешивают в лаборатории при комнатной температуре 22±2ºС, относительной влажности 50-70% и естественном освещении. Испытания тестов начинают через 1 сутки после их подготовки и повторяют для установления длительности защитного действия через 7, 14 и более суток до снижения показателей ниже нормативного. Частоту испытаний определяет испытательная лаборатория (центр). Обратимость нокдауна и длительность инсектицидного действия средства указывают при описании свойств данного средства.

Показатели эффективности: $КБ_5$ – не более 3 экземпляров; $МВ_{ср}$ – не более 20 см.

Метод изучения эффективности инсектоакарицидных средств, предназначенных для защиты людей от нападения комаров, мошек и других летающих кровососущих насекомых.

Такие инсектоакарицидные средства разрешают для обработки одежды, и они бывают представлены концентратами эмульсий, аэрозольными и беспропеллентными упаковками. Исследования

эффективности таких инсектоакарицидных средств возможно провести только в природных условиях (см. раздел 2.8.4.).

2.4.3. Методы изучения защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды

Метод изучения защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды и предназначенных для защиты людей от нападения иксодовых клещей.

Подготовительный этап.

Из белой хлопчатобумажной бязи изготавливают контрольный тест в виде ленты размером 70,0×10,0 см. Контрольный тест не должен соприкасаться с опытными тестами или руками, загрязненными инсектоакарицидами! Для подготовки опытных тестов из изучаемой ткани площадью 2 $м^2$ вырезают из разных мест 3 теста в виде лент размером 70,0×10,0 см. На нижние 10 см опытных тестов наклеивают чистую хлопчатобумажную ткань. Рекомендуется использовать клеящий карандаш или другой клей, предварительно убедившись, что его запах после проветривания не вызывает отпугивания клещей. Карандашом на каждом тесте делают отметки: 5 см от нижнего края теста (место подсадки клеща), 10 см от нижнего края (нулевая отметка – начало испытуемой ткани) и далее через каждые 10 см до отметки 50 см.

Оценку защитных свойств ткани проводят аналогично методу изучения эффективности средств, предназначенных для защиты людей от нападения иксодовых клещей (см. выше п. 2.4.2).

Показатели эффективности: $КТ_{ср}$ – не более 5 мин.; $МВ_{ср}$ – не более 50 см; ИСП – не более 1,1.

Метод изучения защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды и предназначенных для защиты людей от нападения блох.

Подготовительный этап.

Из чистой белой хлопчатобумажной бязи изготавливают контрольный тест в виде полоски размером 50,0×1,5 см. Контрольный тест не должен соприкасаться с опытными тестами или руками, загрязненными инсектоакарицидами! Из изучаемой ткани, содержащей инсектоакарициды, площадью 1 $м^2$ вырезают из разных мест 3 опытных теста в виде полосок размером 50,0×1,5 см. На тесты карандашом наносят отметки длины (5, 10, 15, 20 и т. д. см).

Оценку активности блох и защитных свойств ткани проводят аналогично методам изучения эффективности средств, предназначенных для защиты людей от нападения блох (см. выше п. 2.4.2).

Показатели эффективности: $КБ_5$ – не более 3 экземпляров; $МВ_{ср}$ – не более 20 см.

Метод изучения защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды и предназначенных для защиты людей от нападения комаров, мошек и других летающих насекомых.

Такие исследования можно провести только в природных условиях, где есть неограниченное количество кровососущих летающих насекомых, нападающих на человека для кровососания (см. п. 2.8.7.).

2.4.4. Методы оценки активности акарицидных средств, предназначенных для уничтожения кровососущих гамазовых клещей в помещениях

В качестве биологического материала в лабораторных экспериментах используют голодных половозрелых особей гамазового крысиного клеща O. bacoti. При отборе клещей в эксперимент применяют метод случайной выборки. Подопытные и контрольные клещи должны быть одного возраста. Клещей содержат при оптимальных для них условиях в термостате при температуре воздуха 25-26°С и относительной влажности воздуха 80%. Каждый опыт сопровождают контрольным вариантом.

Оценку эффективности средств, предназначенных для обработки поверхностей в помещениях с целью уничтожения кровососущих гамазовых клещей, проводят в зависимости от препаративной формы средства.

Метод подсадки на обработанную акарицидом тест-поверхность (для исследований активности жидких и порошкообразных форм).

Акарицидное действие средства оценивают в лабораторных условиях на поверхностях двух типов – впитывающей влагу (фанера) и невпитывающей (стекло). Для предотвращения расползания клещей в эксперименте края стеклянных пластин и кусков фанеры стандартного размера 20×10 см обрабатывают репеллентами, эффективными в отношении O. bacoti (20% растворами диметилфталата или акрепа), или в течение времени контактирования клещей не дают им покидать тест-поверхности и возвращают назад при помощи тонкой кисточки.

Острое акарицидное действие определяют методом принудительного контактирования клещей со свежеобработанной поверхностью (после высыхания тест-поверхностей). Время контакта

составляет 5 мин. После этого клещей переносят в чистые стеклянные пробирки с ватно-марлевыми пробками и помещают в термостат. Учет пораженных особей проводят через 24, 48, 72 часа.

Остаточное акарицидное действие средства определяют аналогичным методом, подсаживая клещей на 5 мин. на обработанные тест-поверхности на 3, 7, 14 сутки и более до окончания акарицидного действия. После экспозиции клещей переносят в чистые емкости и помещают в термостат. Учет погибших клещей проводят через 24, 48, 72 часа после контакта с обработанной поверхностью. Стеклянные пластины и фанеру, используемые в опыте, хранят в вертикальном положении при комнатной температуре.

Метод оценки активности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках.

Оценку эффективности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках в отношении крысиных клещей проводят в соответствии со стандартной методикой, изложенной в п. 2.3.1. по испытанию средств в аэрозольных упаковках для уничтожения нелетающих насекомых. При этом для определения острого действия средства крысиных клещей помещают в чашки Петри (не менее 30 особей в каждую), края которых смазывают вазелином или 20% раствором репеллента (диметилфталата, акрепа), чтобы избежать расползания клещей. Чашки Петри размещают в 5 точках в камере и затем обрабатывают средствами в аэрозольной или беспропеллентной упаковке.

Через 10 мин. после нанесения препарата чашки Петри вынимают из камеры и пересаживают клещей в чистые пробирки, которые помещают в термостат. Учет смертности клещей проводят через 24, 48, 72 часа.

Остаточное действие определяют, подсаживая клещей на обработанные средством в аэрозольной или беспропеллентной упаковке тест-поверхности (п. 2.3.1.).

Показатели эффективности: акарицидные средства для борьбы с гамазовыми клещами в помещениях: острое действие – гибель клещей через 24 часа, 100%, остаточное действие – гибель клещей через 24 часа при подсадке на 3 сутки на невпитывающую поверхность, не менее 80%.

2.4.5. Методы оценки активности средств, предназначенных для борьбы с акариформными клещами (чесоточные клещи и клещи домашней пыли)

Методы оценки активности средств (скабицидов), предназначенных для обработки поверхностей в помещениях, одежды, белья и т.д. с целью уничтожения чесоточных клещей.

Оценку эффективности средств, предназначенных для обработки поверхностей в помещениях, одежды, белья и т.д. с целью уничтожения чесоточных клещей, проводят in vitro на модельном объекте – ушном кроличьем клеще P. cuniculi инсектарной культуры.

В зависимости от препаративной формы средства оценку скабицидной активности проводят тремя методами, описанными ниже. Для концентрированного средства – образец интенсивно взбалтывают и на весах отбирают навеску для приготовления серии рабочих концентраций. Путем разбавления водой готовят необходимые концентрации. Готовые препаративные формы испытывают без разведения.

Метод погружения для исследования жидких препаративных форм скабицидов (эмульсии, суспензии, растворы, и т.п.).

Самок клещей по 10 особей помещают на кружок фильтровальной бумаги, свернутой углом в виде «фунтика», погружают в исследуемую рабочую жидкостью на 1 мин. Затем клещей переносят в чистую пробирку со вложенной в нее фильтровальной бумагой. Через 24 часа определяют количество пораженных клещей и подсчитывают процент поражения. Опыты ставят при комнатной температуре в трех повторностях. В качестве контрольного варианта используют необработанных клещей, помещенных в пробирки аналогичным образом.

Метод орошения (опрыскивания) для оценки скабицидной активности средств.

Самок клещей по 10 особей подсаживают в чашки Петри на впитывающую (фильтровальная бумага, бязь) поверхность, после чего чашки Петри с клещами размещают случайным образом в камере в пяти точках и обрабатывают средствами в аэрозольной или беспропеллентной упаковке, или водными рабочими растворами различных препаративных форм при помощи аппаратуры типа «Квазар» или «Росинка» с высоты 20 см, направляя струю средства под углом 45° ко дну камеры. Температура в камере во время опытов должна быть постоянной 22±2°С, относительная влажность – не менее 60%. На края чашек необходимо нанести полоску вазелина для предотвращения расползания клещей. Через 10 мин. чашки Петри вынимают из камеры, клещей пересаживают в чистые пробирки и проводят учет гибели через 24 часа, подсчитывая процент пораженных особей. Опыты проводят при комнатной температуре в трех повторностях. В качестве контроля

используют необработанных клещей, помещенных в пробирки аналогичным образом.

Метод подсадки на обработанную скабицидом поверхность.

Метод применяется для исследований эффективности дустов и других порошкообразных форм, а также для изучения длительности остаточного действия. Самок клещей по 10 особей подсаживают на обработанную средством невпитывающую (стекло) и впитывающую (фильтровальная бумага, бязь) поверхность на 15 мин.

Для установления остаточного действия средства образцы поверхностей - пластинки стекла и фильтровальной бумаги или бязи размером 10×20 см помещают в камеры не менее 5 штук каждой и обрабатывают описанным выше способом. Тест-поверхности оставляют для последующего исследования остаточного действия средства.

После экспозиции клещей пересаживают в чистые пробирки и проводят учет гибели через 24 часа, подсчитывая процент пораженных особей. Опыты проводят при комнатной температуре в трех повторностях. В качестве контроля используют необработанных клещей, помещенных в пробирки аналогичным образом. Определяют эффективные концентрации и норму расхода средства, обеспечивающие достаточное качество (равномерность) нанесения на разные типы поверхностей с обеспечением скабицидной эффективности.

Остаточное действие отложений средства определяют после обработки на 1, 3, 5, 7 сутки и более методом контакта клещей с обработанными поверхностями в течение 15 мин. в экспозиметрах. После контакта с обработанными тестами особей переносят в чистые пробирки и регистрируют их состояние через 24 часа.

Показатели эффективности: острое действие – гибель клещей через 24 часа 100%; остаточное действие – гибель клещей при подсадке

на 3 сутки на невпитывающую поверхность при учете через 24 часа не менее 80 %.

Методы оценки активности средств (акарицидов),
предназначенных для уничтожения клещей домашней пыли.

В качестве биологического материала в лабораторных экспериментах используют культуры клещей домашней пыли сем. Pyroglyphidae: D. pteronyssinus и/или D. farinae. Подопытные и контрольные клещи должны быть одного вида. Клещей содержат при стабильных, оптимальных для их развития условиях, в термостатах при температуре 25-26°С в стеклянных плотно закрытых эксикаторах с относительной влажностью воздуха 80%. Пищевой рацион клещей должен содержать все необходимые компоненты для их нормальной жизнедеятельности.

В лабораторных условиях оценку акарицидной активности средств, предназначенных для борьбы с клещами домашней пыли, проводят на впитывающей тканевой поверхности (бязь). Размеры и форма кусочков бязи, используемой в качестве тест-поверхности, соответствует форме и размеру дна сосуда (бюксы, небольшие стеклянные стаканчики и т.п.), в которых содержат клещей во время экспериментов. Края каждого сосуда с клещами домашней пыли предварительно обклеивают липкой лентой во избежание расползания клещей («ловчий пояс»). Каждый опыт включает не менее 3 повторностей, в каждой из которых используют не менее 20 клещей, и сопровождается контролем.

Метод, используемый для оценки эффективности средств, предназначенных для уничтожения клещей домашней пыли, выбирают в зависимости от препаративной формы средства.

Метод оценки активности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках.

Для оценки эффективности средств в аэрозольной и беспропеллентной упаковках используют стандартный метод опрыскивания членистоногих камере объёмом 1 $м^3$. В пяти точках размещают чашки Петри с клещами, помещенными непосредственно на бязь. Одновременно в камеру также помещают тест-поверхности – кусочки ткани (бязь) – в пяти различных точках для изучения длительности остаточного действия отложений средства. Клещей и бязь орошают средством с расстояния 20-30 см под углом 45°.

Через 10 мин. после орошения клещей переносят в чистую посуду и помещают в эксикаторы. Гибель клещей учитывают через определенные промежутки времени (10 мин., 24, 48 часов после обработки). Пораженными считают мертвых и необратимо парализованных клещей.

Обработанные тест-поверхности (бязь) хранят в подвешенном положении при комнатной температуре. На 1 и 3 сутки после обработки для определения длительности остаточного действия отложений аэрозоля на них подсаживают клещей с добавлением кормового субстрата и оставляют для дальнейшего наблюдения. Учеты гибели клещей проводят в течение 5-14 суток.

Метод подсадки клещей на обработанную тест-поверхность (для исследований активности жидких форм).

Обработанные образцы ткани (бязь) помещают в стеклянный небольшой сосуд. После полного высыхания на бязь подсаживают клещей и добавляют кормовой субстрат. Учет пораженных клещей проводят через 24, 48, 72 часа.

Показатели эффективности: острое действие – гибель клещей через 24 часа не менее 100%.

Метод обработки среды культивирования клещей (для изучения действующих веществ, жидких препаративных форм).

Среду культивирования клещей обрабатывают средством с акарицидной активностью. После полного испарения растворителя в субстрат помещают 30-50 клещей. Учет живых особей проводят через 24, 72 часа, далее один раз в 7 дней в течение 3 недель.

Показатели эффективности: гибель клещей через 3 недели не менее 100%.

2.4.6. Методы изучения системного и контактного действия инсектоакарицидов на теплокровном животном

Метод оценки активности инсекто-родентицидных средств. В опытах используют членистоногих из чувствительных инсектарных культур – крысиную блоху Xenopsylla cheopis и крысиного клеща Ornithonyssus bacoti. Используют непитавшихся имаго блох 1-3-недельного возраста и взрослых голодных клещей без разделения по полу. В качестве прокормителя используют белых лабораторных мышей массой 30-40 г. При отборе для экспериментов блох и клещей соблюдают метод случайной выборки.

Оценку системного действия новых действующих веществ (ДВ) инсектицидов проводят в интервале доз 1-30 мг/кг в два этапа:

а) принудительное введение инсектоакарицида белым мышам перорально и определение диапазона действующих доз в течение 1-7 суток;

б) непосредственное испытание готовых приманок, содержащих инсектоакарицид и родентицид в течение 1-3 суток в зависимости от

химического строения ДВ и вида подопытного членистоногого, содержащих только инсектоакарицид до 8-15 суток.

Метод изучения системного действия инсектоакарицида по отношению к эктопаразитам грызунов (лабораторная культура блох и кровососущих гамазовых клещей) при его принудительном пероральном однократном введении белым мышам.

Белым лабораторным мышам, средней массой 30 г, голодавшим в течение 2-3 часов, однократно перорально вводят по 0,5 мл водных эмульсий инсектицида в дозе 1, 10 и 30 мг/кг (0,03, 0,3 и 0,9 мг/особь, соответственно). Через 1, 2 и 3 суток после введения инсектицида на этих мышей подсаживают голодных членистоногих. При этом отдельно проводят серии экспериментов с блохами и клещами. Для предотвращения счесывания и поедания мышами эктопаразитов, животных помещают в садки размером 3×3×8 см из металлической сетки с ячейками 1×1 см, которые ставят на чашки Петри с вложенными бумажными фильтрами. Далее эти чашки Петри помещают в большие пластмассовые емкости с высокими стенками, которые позволяют сохранить всех клещей и блох, покинувших прокормителя после питания. При использовании в опыте клещей, для предотвращения их разбегания, стенки емкостей смазывают вазелином по верхнему краю. Эксперименты проводят при комнатной температуре 22-25ºС. Каждый опыт сопровождают контрольными вариантами.

Блохи.

На мышей подсаживают по 30 имаго блох на 120 мин. Затем блох собирают из пластиковой емкости, а также счесывают оставшихся насекомых с животных пластмассовым частым гребнем. Учитывают долю напитавшихся блох. Собранных блох помещают в пробирки и

убирают в термостат (28°С, относительная влажность воздуха 70%). Учет смертности напитавшихся блох проводят через 24 часа.

Гамазовые клещи.

На мышей подсаживают по 30-40 взрослых голодных клещей O.bacoti. Далее в течение 4-5 часов собирали напитавшихся клещей и отсаживали их во влажные пробирки, сделанные по методике Е.Н. Нельзиной. Учет смертности клещей проводят через 24 часа.

Метод оценки системного действия приманок, содержащих инсектоакарицид, по отношению к эктопаразитам грызунов (лабораторная культура блох и кровососущих гамазовых клещей).

Эффективность приманок определяют путем ежедневной подсадки в течение трех суток клещей и блох на мышей, постоянно питающихся приманкой, содержащей инсектоакарицид.

Оценка поедаемости корма белыми мышами в эксперименте.

Оценку поедаемости приманок проводят путем ежедневного взвешивания корма на электронных лабораторных весах с точностью взвешивания 0,005 г. Поедаемость корма выражают в граммах на одну особь в сутки. Рассчитывают дозу поглощенного мышью ДВ (мг/кг массы животного в сутки) исходя из содержания его в корме (%ДВ) и установленной поедаемости приманки.

Определение системного действия в отношении кровососущих гамазовых клещей и блох содержащей инсектоакарицид приманки при скармливании ее белым мышам.

Членистоногих (раздельно блох и клещей) ежедневно в течение 1-7 суток эксперимента подсаживают на мышей, постоянно питающихся приманкой с инсектоакарицидом.

Показатели эффективности.

При введении растворов принудительно перорально белым мышам: смертность блох и кровососущих гамазовых клещей при кормлении на 1, 2, 3 сутки после введения инсектицида составляет не менее 80% при учете через 24 часа; при скармливании отравленной приманки: поедаемость не менее 80% от таковой в контрольном варианте (необработанная приманка); смертность блох и клещей – при кормлении на мышах на 3 сутки не менее 80% при учете через 24 часа.

Метод изучения продолжительности контактного действия инсектицидов на крысиных блох при испытании на белых мышах.

В лабораторных исследованиях проводят на непитавшихся имаго блох 1-3-недельного возраста без разделения по полу крысиной блохи Xenopsylla cheopis из чувствительной инсектарной культуры. В качестве прокормителя используют белых лабораторных мышей массой 30-40 г. При отборе насекомых для экспериментов соблюдают метод случайной выборки.

При проведении исследований наносят препарат на экспериментальных животных в широком диапазоне доз: 1, 10, 50, 100, 200 мг ДВ/кг массы животного.

Рекомендуемые схемы проведения опытов для изучения предлагаемых к испытанию средств на основе различных ДВ:

а) для ФОС – определение продолжительности действия следует проводить через 2, 24, 48, 72 и 168 часов после нанесения на животное;

б) для инсектицидов, обладающих выраженным остаточным действием – пиретроидов, фенилпиразолов, неоникотиноидов – блох следует подсаживать еженедельно вплоть до снижения показателей инсектицидного действия ниже 50%.

Уход блох с животного может быть вызван разным причинами:

1) окончание питания (в контрольном варианте в течение 120 мин. до 20% насекомых обычно покидают животное);

2) отпугивающее действие инсектицида;

3) паралич насекомых, за счет чего блохи падают с животного.

Не имея возможности разграничить причины, по которым блохи покидают прокормителя, термин «отпугивающее» действие приводится в кавычках.

Метод изучения продолжительности остаточного действия инсектицидов на крысиную блоху.

Белых лабораторных мышей средней массой 30 г помещают в садки размером 3×3×8 см из металлической сетки с ячейками 1×1 см и обрабатывают 0,1 мл инсектицида, равномерно нанося капли сверху по обеим сторонам позвоночника животного. Необходимые концентрации инсектицида получают последовательным разведением препаративных форм инсектицидов эфиром пропиленгликоля. В опытах используют дозы 1-100 мг ДВ инсектицида на кг массы животного (0,03-3,0 мг ДВ на мышь, соответственно). Садки ставят в чашки Петри с вложенными бумажными фильтрами и помещают в большие пластмассовые емкости с высокими стенками. Через 2 часа после нанесения инсектицида подсаживают на мышей имаго блох (не менее 30 насекомых в повторности). В течение 120 мин. учитывают «отпугивающее» действие (уход блох с тела животного) с интервалом 15-30 мин. Затем блох собирают из пластиковой емкости, а также счесывают оставшихся насекомых с животных частым пластмассовым гребнем, который используют однократно. Учитывают долю напитавшихся блох, блох покинувших прокормителя и оставшихся на теле животного. Собранных блох помещают в пробирки и убирают в термостат (28°С, относительная влажность воздуха 70%). Гибель насекомых учитывают

через 24 часа. Остаточное действие испытуемых средств определяют тем же методом, используя обработанных ранее мышей, каждую из которых содержат в отдельной клетке. Блох подсаживают через 1, 3, 7 суток и далее еженедельно до прекращения действия средства (срок наблюдения 30-35 суток). Опыты проводят в двух-трехкратной повторности, используя в каждой не менее 30 насекомых. Каждый опыт сопровождают двумя контрольными вариантами: подсадка блох на обработанное растворителем и необработанное животное. Эксперименты проводят при комнатной температуре (22-25ºС).

Для сравнения результатов используют показатели продолжительности «отпугивающего» ($ОТ_{50}$ и $ОТ_{95}$ – время, в течение которого обработанное животное покидают 50% и 95% блох, соответственно) и инсектицидного действия ($СТ_{50}$ и $СТ_{95}$ – время, в течение которого погибают соответственно 50% и 95% блох в эксперименте), выраженные в сутках.

2.5. Методы определения эффективности репеллентных средств

2.5.1. Методы оценки эффективности репеллентных средств и изделий в отношении насекомых

Метод оценки активности репеллентных средств, предназначенных для нанесения на кожу (кремы, лосьоны, эмульсии, салфетки, карандаши, аэрозоли).

К испытаниям допускаются только средства имеющие подтверждение безопасности их применения на кожу людей. В опытах используют голодных самок Ae.aegypti инсектарной культуры в возрасте 8-10 дней, получавших углеводное питание. В сетчатый садок размером 30×30×30 см выпускают 50±5 самок. Такие условия опыта соответствуют высокой численности комаров. Испытания репеллентных

средств начинают через 30 мин. после запуска комаров. Опыты проводят при температуре воздуха 25±2ºС, относительной влажности 60-70%, при рассеянном освещении, избегая прямого солнечного света. Испытания должны быть проведены с 9 до 14 часов.

Чтобы подтвердить активность комаров, в садок помещают оголенное предплечье испытателя, защитив кисть руки резиновой перчаткой. Проводят учет посадок и укусов комаров в течение 30 сек. Активность комаров признается удовлетворительной, если за этот период зарегистрировано не менее 10 посадок и 3 укусов. После этого изучаемое средство наносят на всю поверхность обнаженного предплечья испытателя в норме расхода 0,1 мл (г) на 100 $см^2$ кожи. Предплечье второй руки обрабатывают в той же норме расхода эталоном предполагаемой категории эффективности. Эталоном высшей категории эффективности является 30% раствор ДЭТА в этиловом спирте, эталоном первой категории – 20% раствор ДЭТА, эталоном второй категории – 10% раствор ДЭТА, эталоном третьей категории – 5% раствор ДЭТА, эталоном четвертой категории – 3% раствор ДЭТА. Обе руки помещают в садок с комарами на 3 мин. и регистрируют число посадок и укусов комаров. Сразу после нанесения репеллентные средства, как правило, обеспечивают отпугивание всех насекомых, то есть КОД равен 100%. С целью определения длительности репеллентного действия (ДРД) проводят повторение опыта через каждые 30 мин. до тех пор, пока не будет зарегистрировано 3 или более укусов за 3 мин. испытания. В каждом садке повторное испытание можно проводить не ранее, чем через час после предыдущего. Каждое средство испытывают не менее чем три испытателя не менее чем в трех повторностях (всего 9 повторностей). Рассчитывают среднее значение

ДРД. Изученные средства распределяют по категориям эффективности репеллентных средств, ориентируясь на показатели.

К высшей категории эффективности относят средства, у которых ДРД составляет 4 и более часа, к 1 категории – 3 и более до 4, ко 2 категории – 2 и более до 3, к 3 категории – 1 и более до 2, к 4 категории – 1 и более до 2 (при низкой численности комаров).

Если предполагается, что репеллентное средство соответствует 4 категории эффективности, то его испытания проводятся при определенных изменениях в методике опытов, приводящих к снижению агрессивности комаров: в садок размером 50×50×50 см выпускают 20±2 самки. Все остальные условия опыта остаются прежними.

Показатели эффективности.

КОД – 100 %, длительность репеллентного действия в часах в соответствии с категориями эффективности: высшая категория – 4 и более (в этикетке указывают защитное действие от насекомых более 4 часов), 1 категория – 3 и более до 4 (в этикетке указывают защитное действие от насекомых до 4 часов), 2 категория – 2 и более до 3 (в этикетке указывают защитное действие от насекомых до 3 часов), 3 категория – 1 и более до 2 (в этикетке указывают защитное действие от насекомых до 2 часов), 4 категория – 1 и более до 2 (в этикетке указывают защитное действие от насекомых до 2 часов при низкой численности комаров).

Полный спектр репеллентного действия средства определяется на основании изучения эффективности средства в натурных условиях или на основании литературных данных.

Метод оценки активности репеллентных средств в виде аэрозолей, предназначенных для защиты от двукрылых насекомых при нанесении на одежду.

Применяют метод обработанных рукавов. Рукава подготавливают из хлопчатобумажной бязи (ткань рукава должна довольно плотно прилегать к предплечью испытателя) и обрабатывают ткань аэрозолем из расчета 20 г/м^2. Испытание репеллентной эффективности проводят первый раз после полного высыхания ткани (примерно через 1 час) и затем через 1, 2, 3, 5 и далее суток. В промежутках между испытаниями рукава подвешивают в лаборатории при комнатной температуре 22±2ºС, относительной влажности 60-70% и естественном освещении. При испытаниях обработанный рукав надевают на предплечье испытателя (кисть руки в резиновой перчатке) и руку помещают в садок с комарами аналогично методике, описанной выше. Окончанием репеллентного действия считаются сутки, когда регистрируют 3 или более укусов комаров через ткань рукава за 10 мин. испытания.

Показатели эффективности:

КОД – 100 %, ДРД в сутках в соответствии с категориями эффективности: высшая категория – 20 и более суток (в этикетке указывается защитное действие от насекомых более 20 суток), 1 категория – 10 и более до 20 суток (в этикетке указывается защитное действие от насекомых до 20 суток), 2 категория – 5 и более до 10 (в этикетке указывается защитное действие от насекомых до 10 суток), 3 категория – 3 и более до 5 (в этикетке указывается защитное действие от насекомых до 5 суток).

Методы оценки активности репеллентных средств, предназначенных для защиты от муравьев.

Оценку эффективности средств, предназначенных для защиты от муравьев, осуществляют на основании исследований в природных биотопах (см. раздел 2.8.7).

Метод изучения защитных свойств изделий, содержащих репелленты и предназначенных для защиты людей от нападения комаров.

Метод предназначен для определения защитных свойств репеллентных браслетов, наклеек и других изделий, обладающих репеллентными свойствами в отношении кровососущих комаров и предназначенных для защиты людей от их нападения.

Исследования проводят в лабораторных условиях по отношению к инсектарной культуре комаров Aedes aegypti. Выведенных в инсектарии самок 20±2 особей в возрасте 8-10 дней, содержавшихся на углеводном питании, помещают в сетчатый садок размером 50×50×50 см. Такая постановка опыта является имитацией низкой численности комаров, поскольку известно, что плотность комаров в садке определяет их агрессивность.

Если изделие (например, наклейка) предназначено для наклеивания на одежду, образец для испытаний приклеивают на полоску из бязи шире, чем образец, не менее чем на 1 см.

Опыты проводят с 9 до 14 часов при температуре воздуха 25±2ºС, относительной влажности 60-70% и естественном освещении.

Перед началом испытаний в садок помещают предплечье (кисть руки защищают резиновой перчаткой) и проводят контрольный учет: в течение 1 мин. учитывают количество укусов комаров за предплечье.

Активность комаров считается достаточной, если за контрольный учет зарегистрировано не менее 3 укусов при имитации низкой численности.

Для испытаний браслет надевают на запястье, полоску из бязи с приклеенным изделием закрепляют на предплечье около локтя. Используют садки с комарами, которые ранее не были в опытах. При проведении опытов испытатель помещает предплечье с браслетом или закрепленным другим образцом изделия в садок и проводят 3-минутные учеты количества укусов комаров за предплечье и кисть испытателя.

Коэффициент защитного действия ($КЗД_{комары}$ в процентах) вычисляют по формуле 19, где А – количество укусов комаров на руке без изделия (контроль) в пересчете на 3 минуты (продолжительность опыта); Б – количество укусов комаров на руке с изделием (опыт).

Каждый опыт проводят в 9 повторностях (3 испытателя по 3 повторности) и рассчитывают средний показатель защитного действия ($КЗД_{комары}$).

Опыты начинают через 15 мин. после извлечения изделия из упаковки. Для установления длительности защитного действия проводят повторные испытания до снижения $КЗД_{комары}$ ниже нормативного. Частоту испытаний определяет испытательная лаборатория (центр) исходя из заявленной длительности защитного действия. Между опытами изделия подвешивают в проветриваемом помещении, при температуре 22±2ºС, относительной влажности 60-70% и естественном освещении. Для браслетов, наклеек и других подобных изделий, показавших $КЗД_{комары}$ менее 90%, в этикетке указывают назначение «для снижения количества укусов комаров». Для изделий, показавших $КЗД_{комары}$ равный или более 90%, в этикетке указывают «для защиты от укусов комаров». Длительность защитного действия указывают в этикетке.

Показатель эффективности: $КЗД_{комары}$ – не менее 30%.

2.5.2. Методы оценки эффективности репеллентных средств для защиты от иксодовых клещей

Метод оценки активности репеллентных средств в виде аэрозолей, предназначенных для защиты от иксодовых клещей при нанесении на одежду. Используется тест из хлопчатобумажной бязи – лента 10×70 см, который закрепляют на впитывающей поверхности (ткань, фильтровальная бумага и т. п.) размером 0,5 $м^2$, прикрыв полиэтиленом нижние 10 см. Затем эту поверхность с тестом закрепляют вертикально и обрабатывают аэрозолем в соответствии с рекомендуемой нормой расхода, обычно 20 $г/м^2$ поверхности.

После обработки тесты открепляют, просушивают и развешивают в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности, освещенности. Опыты проводят в день обработки. Тесты закрепляют под углом 70º к горизонту. Клещей по одному помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от хоботка (гипостома). Регистрируют число клещей, проползших отрезок, обработанный репеллентным средством, длиной 50 см. На контрольном тесте, как правило, все клещи проползают отмеченную зону. После испытаний клещей помещают в 70% раствор этилового спирта с целью их консервации или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Опыт проводят не менее чем с 30 самками. Рассчитывают КОД, который в данном случае равен доле клещей (в процентах), не проползших обработанную зону от числа клещей в опыте. Результаты опытов трактуют в сравнении с результатами испытаний эталонного теста. Для определения

длительности репеллентного действия испытания повторяют ежедневно до тех пор, пока КОД сохраняется равным или выше 90%. Поскольку репеллентные средства не защищают полностью от клещей – переносчиков возбудителей опасных заболеваний, в тексте этикетки (для быта) указывают «Средство обеспечивает неполную защиту от клещей. Будьте внимательны!»

Показатели эффективности: КОД – 95% и более, ДРД – 3 и более суток.

Метод оценки акарицидно-репеллентных средств в виде аэрозолей предназначенных для защиты от иксодовых клещей при нанесении на одежду.

Оценка акарицидно-репеллентных средств проводится по двум направлениям, как акарицидного средства и как репеллентного. Тест подготавливается по п. 2.4.2. Изучение эффективности проводится по п. 2.4.2., 2.5.2. Определяются показатели $КТ_{ср}$, $МВ_{ср}$, ИСП, КОД и ДРД.

2.5.3. Метод оценки активности репеллентных средств в отношении гамазовых клещей

Оценку эффективности репеллентых средств в отношении O. bacoti проводят при помощи методики, разработанной для иксодовых клещей, при этом оценивается отрицательная локомоторная реакция клеща на границе химического барьера, представляющего собой репеллент, нанесенный на субстрат на пути следования клещей. Путь следования определяется отрицательным геотропизмом голодных клещей O. bacoti, подкрепленным привлекающим фактором добычи (рука экспериментатора). Отпугивающее действие исследуют на 1, 3 и 5 сутки после обработки. Опыт с каждым соединением проводят не

менее, чем в 3 повторностях, используя не менее 30 клещей в каждой. В опыте используют голодных самок крысиного клеща.

Для оценки репеллентной активности веществ вычисляют коэффициент отпугивающего действия (КОД) по формуле 12. Длительность репеллентного действия (ДРД) оценивают как время (в сутках), в течение которого зону, обработанную репеллентом, проходят не более 30% клещей.

2.6. Методы определения активности средств на основе регуляторов развития насекомых

Группа регуляторов развития насекомых (РРН) объединяет соединения, являющиеся по механизму действия аналогами природных гормонов насекомых: ювенильного (АЮГ или ювеноиды), линочного (ЛГ или экдизоиды); нейрогормонов и др. В эту группу входят также химические соединения, не являющиеся по структуре аналогами природных гормонов, но вызывающие у насекомых гормоноподобные эффекты. К ним относятся ингибиторы синтеза хитина (ИСХ): хлор- и фторпроизводные мочевины (дифлубензурон, тримфлумурон, гексафлумурон и др.). Из группы аналогов ювенильного гормона в РФ наиболее известен метопрен, гидропрен и пирипроксифен. Для характеристики активности АЮГ и ИСХ используются величины эффективных концентраций и доз, вызывающие морфогенетические или прочие изменения у 50, 95 или 99% биообъектов.

Механизм действия АЮГ заключается в том, что введение экзогенного аналога в тот период, когда титр истинного гормона в организме насекомого минимален («критический период»), вызывает эффекты, отсутствующие при нормальном прохождении метаморфоза. Поскольку эти соединения являются аналогами природного гормона, то

организм реагирует на их появление (присутствие) образованием промежуточных особей, гигантских, сильно меланизированных личинок, недоразвитых куколок с развитой головой имаго и т.п.

Ингибиторы синтеза хитина – это соединения, которые ингибируют процесс образования глюкозы, необходимой для синтеза хитина. Из-за ее отсутствия ослабляется связь между эндо- и экзокутикулой: она расслаивается, и насекомое не может завершить процесс окукливания. При воздействии ИСХ – различные нарушения линьки на протяжении всего цикла развития от яйца до начала окукливания и отсутствие куколок. Появление куколок - свидетельство окончания срока действия ИСХ.

При воздействии АЮГ: нарушения морфогенеза на протяжении всего цикла развития, отсутствие вылета (выплода) имаго, появление неполноценных имаго или особей с признаками предшествующей фазы развития – «адультоидов».

При оценке активности РРН основным условиям является использование в экспериментах строго выровненного по возрасту (не менее 5-6 часов со времени последней линьки) биологического материала: при оценке аналогов ювенильного гормона (АЮГ) используют личинок последнего возраста; при оценке активности ингибиторов синтеза хитина (ИСХ) – личинок самых ранних возрастов для всех биологических объектов.

На весах берется навеска вещества или средства, представленного для определения его активности, и готовятся серии концентраций. В том случае, если средство представляет собой жидкую форму, оно интенсивно взбалтывается и после этого берется навеска, если это гранулы или порошкообразные формы, то берется навеска без предварительных манипуляций.

Методы оценки активности РРН.

Оценку активности РРН проводят на личинках желтолихорадочного комара Ae. aegypti при испытании АЮГ – 4 возраста; личинках крысиных блох X. cheopis, комнатных мух M. domestica, рыжих тараканов B. germanica последних возрастов инсектарных культур; при оценке ИСХ в экспериментах используют ранние возраста личинок указанных видов.

Метод оценки активности РРН в отношении комаров.

При испытании РРН в отношении личинок комаров их вносят в сосуды с водой, где содержатся личинки комаров IV возраста при испытании АЮГ, и 1-2 возрастов при испытании ИСХ. Наблюдения за их развитием проводят постоянно, ежедневно регистрируя особей с признаками начала окукливания, затем – формирующих куколку.

Показателями эффективности АЮГ являются:

1) отсутствие нормально сформированной куколки;

2) наличие особей, которые не смогли освободиться от экзувия;

3) особей, которые не смогли подняться с поверхности воды.

Показателями эффективности ИСХ является количество погибших личинок при очередной линьке. Учет эффективности проводят ежедневно с целью регистрации нарушений в их развитии в течение 4-5 дней. Подсчитывают количество личинок с морфогенетическими нарушениями.

При оценке эффективности РРН в форме брикетов (гранул) исходят из нормы расхода: 1 брикет массой до 10 г на 10 $м^2$ водной поверхности. Строго выдерживают температуру, необходимую для развития личинок 27±2°С, поскольку в зависимости от температуры меняются сроки развития. Учет эффективности проводят ежедневно, регистрируя количество деформированных личинок. Из-за медленной

диффузии ДВ в воду из этой формы, в отличие от жидких и порошкообразных форм, при использовании которых ДВ сразу попадает в воду, эффект проявляется медленнее.

Метод оценки активности РРН в отношении комнатных мух.

Препаративные формы на основе РРН вносят в субстрат, где происходит развитие преимагинальных стадий в период, когда преобладают личинки первого (ИСХ) или последнего (АЮГ) возраста. Показатель эффективности – отсутствие нормально сформированных куколок (ИСХ) и отсутствие вылета нормально сформированного имаго (АЮГ).

Метод оценки активности приманок на основе РРН в отношении комнатных мух. Пищевую приманку с регулятором развития насекомых ставят в садок размером 30×30×30 см, в который запускают 50-100 имаго 3-4-дневных комнатных мух. В этот же садок ставят субстрат для откладки яиц (смесь отрубей с водой и молоком) и поилки с водой. Наблюдения ведут ежедневно в течение 5 суток до получения яйцекладок.

Строго выдерживают температуру, необходимую для развития личинок 20±2°С, поскольку в зависимости от температуры меняются сроки развития: при 20°С – 4 дня, при 16°С – 6-8 дней. Учет проводят ежедневно.

Метод оценки активности РРН в отношении крысиных блох.

В субстрат для развития личинок (тонкий слой песка, предварительно, во избежание заплесневения, прокаленный в течение 2 часов и смешанный с сухим стандартным альбумином и пивными дрожжами: 3 г альбумина на 10 г песка) вносят раствор РРН в ацетоне. После испарения растворителя по 30 личинок блох последнего возраста

помещают в субстрат. Эффективность оценивают, подсчитывая ежедневно личинок с нарушением метаморфоза.

Показатели эффективности:

1) нарушения в развитии личинок;

2) отсутствие нормально сформированного кокона;

3) отсутствие выплода жизнеспособных имаго.

Метод оценки активности РРН в отношении муравьев.

Активность приманок, содержащих РРН в отношении колоний муравьев оценивается по п. 2.3.2.

Метод оценки активности пищевой приманки с РРН в отношении тараканов.

Пищевую приманку с РРН ставят в пластиковые боксы размером 20×20×30 см, в который вносят имаго и личинок тараканов (самцы:самки:личинки в соотношении 1:1:4). В этот же садок ставят поилки с водой. Наблюдения ведут ежедневно в течение 7 суток, подсчитывая количество личинок с морфологическими изменениями. Особи с явными нарушениями в развитии появляются не ранее, чем через 5-7 дней.

Учет эффективности РРН:

1) количество особей с нарушениями (сильномеланизированные личинки, промежуточные формы с признаками имаго);

2) отсутствие жизнеспособных оотек;

3) выплод нормального поколения.

Метод изучения инсектицидных фумигирующих средств на основе РРН (гидропрена) в отношении тараканов.

Для определения биологической активности инсектицидных фумигирующих устройств (средств), выполненных в форме диска-фумигатора, в которых в качестве ДВ используют АЮГ гидропрен,

необходима специальная установка. Это связано с тем, что пары гидропрена, испаряясь с поверхности диска-фумигатора (или другого устройства), обладают способностью проникать в щели и трещины, где укрываются тараканы, и губительно воздействовать на них. Эксперименты проводят в системе из сообщающихся между собой с помощью переходника 15×15×30 мм бокса из прозрачного оргстекла 200×200×200 мм и лабиринта с крышкой 200×200×40 мм.

Такая конструкция позволяет создать длину пробега насекомых в одном лабиринте равную двум метрам, сохраняя компактность установки, и проводить наблюдения за влиянием гидропрена на уровне модельной группы тараканов в условиях, максимально приближенных к естественным, в течение продолжительного периода жизни насекомых. Лабиринты выполняют функцию убежища (имитация щелей и трещин), и поэтому они должны быть затемнены черной светонепроницаемой бумагой. В опытном варианте в боксы устанавливают диски-фумигаторы (или другие аналогичные устройства), кормушки и поилки с водой. В контрольном варианте в боксах создают те же условия, но без дисков-фумигаторов. Эксперименты ставят при комнатной температуре воздуха 20-24°С и естественном свето-темновом режиме.

Эксперименты ставят в 3-х повторностях. В каждой повторности используют по 60 тараканов (10 самок, 10 самцов и 40 личинок) с учетом естественного соотношения особей в популяции рыжих тараканов 1:1:4. Учеты погибших тараканов, а также наблюдения за появлением меланизированных особей и тараканов с морфологическими отклонениями проводят на 1, 2, 3, 6-10, 13-14, 21, 28 сутки и далее через 5, 6, 7, 8, 9, 10 недель. Кроме того, отслеживают появление оотек у самок и процесс отрождения из них личинок первого возраста (в течение 10 недель) и вносят в таблицу. Для определения

целевой эффективности исследуемого средства с АЮГ оценивают: отсутствие имаго и появление меланизированных и уродливых особей, а также отсутствие роста популяции. Статистическую обработку результатов (величину ошибки выборочной средней) проводят согласно математико-статистическим методам, применяемым в биологических исследованиях.

Показатели эффективности.

При внесении РРН в среду обитания – жидкие формы: деформированных личинок-комаров – 2 (ИСХ) или 4 (АЮГ) возраста, через 2-4 суток не менее 90%, блох – через 3 суток не менее 95%; плавающие формы (брикеты, гранулы): деформированных личинок комаров через 4-5 суток не менее 95%; гранулы для борьбы с мухами: деформированных личинок мух через 4-5 суток, не менее 95%.

Пищевые приманки с РРН:

а) для мух: стерильность самок, отсутствие яйцекладок через 5 дней, жизнеспособных яиц не более 5%, деформированных личинок через 2-3 суток не менее 95%;

б) для тараканов: деформированных личинок через 5-7суток не менее 95%.

Диски-фумигаторы с АЮГ для тараканов: через 2 недели появление единичных меланизированных и деформированных личинок.

2.7. Методы оценки активности аттрактантов (феромонов)

Аттрактанты (феромоны) подразделяются на половые, аггрегационные, следовые, тревоги и яйцекладки.

Половые феромоны являются основным средством коммуникации особей членистоногих разного пола, обеспечивая процесс спаривания. Запахи, которые выделяют самки членистоногих, служат, главным

образом, для привлечения самцов. Феромоны могут выделяться и самцами для привлечения и полового возбуждения самок.

Аггрегационные феромоны обуславливают существование группировок насекомых в определенном месте. Так, например, очень активен аггрегационный феромон у тараканових. Основное количество этого феромона обнаружено в экскрементах тараканов.

Следовые феромоны – этим химическим стимулом насекомые метят пути своего передвижения; феромонами яйцекладки насекомые отмечают места, оптимальные для яйцекладок; феромоны тревоги являются химическими стимулами, с помощью которых насекомые информируют друг друга о возможной опасности.

В составе различных препаративных форм, применяемых в практике медицинской дезинсекции, используются как половые феромоны, так и аггрегационные феромоны для привлечения особей к инсектицидной приманке или клейкой поверхности.

Оценку эффективности аттрактантов и феромонов проводят на имаго комнатных мух M. domestica и рыжих тараканов B. germanica.

Метод оценки активности аттрактантов (феромонов) для рыжих тараканов.

Оценка эффективности аттрактантов (феромонов) проводят на рыжих тараканах инсектарной культуры. Для этого используют бокс из оргстекла 20×20×30 см, на верхнюю часть внутренней поверхности которого нанесена полоска вазелина шириною 2 см, препятствующая выползанию насекомых. В бокс помещают по 20 самок, 20 самцов и 80 личинок II-IV возрастов. Далее помещают аттрактант (феромон) на клейкую поверхность в центре бокса. Параллельно ставят контрольный вариант: в бокс помещают клейкую поверхность без феромона

аналогичной площади. Учеты эффективности проводят через 24 часа. Повторность опыта трехкратная.

Метод оценки активности аттрактантов (феромонов) для комнатных мух.

Готовят два одинаковых садка размером 30×30×30 см, в которые помещают по 50 штук имаго комнатных мух. В опытном варианте в садок помещают лист бумаги размером 5×5 см с нанесенным на него энтомологическим клеем и тестируемым средством. В контрольный садок – аналогичный лист бумаги только с клеем. Наблюдения ведут в течение 3 минут, подсчитывают количество прилипших мух в опытном и контрольном вариантах. Далее рассчитывают коэффициент аттрактивного действия (КАД) (опыт – контроль): 50.

Метод оценки активности привлекающего или отпугивающего действия для комнатных мух.

Используют ольфактометр, состоящий из двух герметичных камер объемом 0,5 $м^3$, между которыми закреплен марлевый садок с двумя цилиндрическими переходами в каждую камеру. Выходные отверстия переходов, открывающиеся в камеры, устроены по принципу верши, чтобы препятствовать обратному лёту мух из опытной камеры в садок. В одну камеру помещают средство или кружок фильтровальной бумаги (диаметр 5-10 см) с нанесенным испытуемым веществом или препаратом, подвешивая его по центру в нижней трети объема. В обе камеры и в садок помещают поилки с водой. Ольфактометр располагают таким образом, чтобы исключить влияние фототаксиса мух на предпочтение камеры. Мух в количестве около 500 штук выпускают в садок и регистрируют количество особей, вылетевших в опытную и контрольную камеры. Опыт проводят в двух повторностях, меняя положение камеры со средством (справа или слева). Учет мух

переместившихся из садка в камеры подсчитывают каждые 30 мин.-1 час в течение 6 часов. Через 24 часа камеры разъединяют и подсчитывают количество особей в камерах и в садке.

Коэффициент отпугивающего действия ($КОД_{мухи}$) при учете через 24 часа рассчитывают по формуле 20, где: О – количество насекомых в опытной камере, К – количество насекомых в контрольном (холостом) варианте, N – количество насекомых всего в опыте.

Коэффициент привлекающего (аттрактивного) действия ($КАД_{мухи}$) при учете через 24 часа рассчитывают по формуле 21, где: О – количество насекомых в опытной камере, К – количество насекомых в контрольном (холостом) варианте, N – количество насекомых всего в опыте.

Метод оценки активности пищевых приманок, содержащих феромон, для комнатных мух.

Оценка активности пищевых приманок, содержащих в качестве действующего вещества различные инсектициды в композиции с феромоном цис-трикозеном, осуществляется по методу, изложенному в п. 2.3.3. с модификациями. В садок размером 30×30×30 см помещают приманку с феромоном, во второй садок – эту же приманку без феромона. Наблюдения ведут в течение нескольких часов, проводя учеты через 15 мин., 30 мин., 1, 2, 3, 6 и 24 часа. Рассчитывают коэффициент аттрактивного действия (КАД), и смертность, %.

Показатели эффективности.

Аттрактанты (феромоны) (половые, аггрегации, пищевые):

а) для мух за 3 мин. КАД не менее 50%,

б) для тараканов за 24 часов КАД не менее 50%;

в) при испытании в камерах при учете через 24 часа – для мух КАДмухи не менее 20%, $КОД_{мухи}$ – не менее 40%, при учете через 24 часа.

2.8. Методы определения эффективности инсектицидных, акарицидных и репеллентных средств в натурных условиях

2.8.1. Общие требования к проведению испытаний в натурных условиях

На основании изучения в лабораторных условиях инсектицидной, акарицидной, рострегулирующей, репеллентной активности субстанций и их препаративных форм определяют эффективные концентрации и нормы расхода по отношению к разным видам членистоногих, имеющим эпидемиологическое и санитарно-гигиеническое значение (спектр действия) и ориентировочную кратность обработок.

Поскольку реальные условия применения средств значительно отличаются от лабораторных, часто бывает важно, а иногда обязательно проводить испытания в натурных условиях. Под натурными условиями понимаются реальные условия применения дезинфекционных средств. Объектами в данном случае являются жилые помещения, заселенные синантропными насекомыми, природные биотопы, транспортные средства и т.д.

На первом этапе определяют оптимальные режимы обработок в зависимости от типа объектов и используемой аппаратуры, возможные побочные явления, которые могут возникнуть у людей, контактировавших с препаратом (проводящих обработку, находящихся в обработанных помещениях, или использующих репеллентные средства). Эти испытания проводят на ограниченном количестве объектов.

2.8.2. Изучение эффективности инсектицидных средств острого действия в натурных условиях

Изучение эффективности инсектицидных средств по отношению к тараканам, постельным клопам и блохам. При обследовании объекта на наличие постельных клопов и тараканов используют визуальный контроль, отмечая места нахождения насекомых и их количество. Степень заселенности насекомыми помещения оценивают следующими показателями (см. таблицу). Визуальную оценку количества тараканов в объекте целесообразно проводить в часы их активности – вечером.

Учет количества тараканов можно проводить, расставляя ловушки разных типов: картонные укрытия с липкой массой, а также ловушки, содержащие в качестве приманки аттрактанты или феромоны тараканов в сочетании с клеем. В качестве ловушек могут быть использованы стеклянные банки емкостью 200-250 мл, в которых в качестве приманки используют куски хлеба, смоченные пивом, пивные дрожжи, кусочки яблока. Ловушки расставляют из расчета 1 экз. на 10 $м^2$ пола и не менее 2 экз. в помещениях до 20 $м^2$.

Насекомые	Степень заселенности помещения площадью 20 $м^2$		
	Малая	Средняя	Высокая
Постельные клопы	Единичные	До 10 мест скопления насекомых	Свыше 10 мест скопления насекомых
Синантропные тараканы	Единичные	3-5 экземпляров	Свыше 5 экземпляров

Инсектициды контактного действия наносят на поверхности стен и предметов обстановки в местах обитания насекомых. Расход жидкости составляет 50-100 мл на 1 $м^2$, дуста – 2-5 г на 1 $м^2$ в зависимости от типа обрабатываемой поверхности и действующего вещества в дусте.

Учет эффективности обработок проводят первый раз через 24 часа после обработки, затем каждые 5-7 дней в течение месяца. При обследовании объекта после обработки подсчитывают количество погибших насекомых (по полу и возрасту). При учете эффективности обработки необходимо использовать средства активизирующие выход клопов и тараканов из укрытий (средства в аэрозольных упаковках). Если в течение 2 недель не обнаружены живые насекомые, последующие обследования проводят раз в 2 недели в течение 2 месяцев.

При оценке эффективности обработок по отношению к блохам используют липкие листы 20×30 см, которые раскладывают на полу под предметами обстановки из расчета 2 листа на 10 $м^2$ площади. Если на 1 лист в течение первых суток попало в среднем не более 2 блох, считают, что в помещении «блохи единичные», от 3 до 10 – «блох много», более 10 – «блох очень много».

Показатели эффективности.

Эффективными считают средства, которые обеспечивают 100% гибель насекомых в объектах в течение 1-2 суток и обладают остаточным инсектицидным действием не менее 3-х недель. Для одномоментного уничтожения насекомых могут быть отобраны средства острого действия, у которых остаточная инсектицидная активность не превышает 3 суток.

Изучение эффективности инсектицидных средств по отношению к мухам. При изучении ларвицидной активности средств органические отходы в сборниках разного типа, в которых происходит развитие преимагинальных фаз мух, обрабатывают водными растворами (эмульсиями, суспензиями) и дустами инсектицидов. Норма расхода рабочих растворов (эмульсий, суспензий) составляет 0,5-5 л на 1 $м^2$ для

твердых отходов при толщине слоя до 30-50 см, при толщине слоя субстрата свыше 50 см – 2-12 л на 1 м^2. Норма расхода дуста (порошка) – 150-300 г на 1 м^2. Одновременно обрабатывают не менее 3 объектов одного типа.

Перед началом обработки проводят учет численности преимагинальных фаз развития мух (личинок и куколок) в каждом отдельном биотопе. При учете численности личинок и куколок мух в скоплениях твердых отходов в мусоросборниках, штабелях мусора, компостах не менее чем в 5-6 точках отбрасывают верхний слой мусора или навоза на площадках размером примерно 20×25 см и отмечают наличие личинок по шкале; личинок нет (0), личинки единичные – до 5 на площадке (+), личинки встречаются десятками (++), личинки встречаются сотнями (+++). В скоплениях жидких отходов наличие личинок отмечают по той же шкале при осмотре поверхности субстрата.

Проверку эффективности инсектицидов проводят 1 раз в 3 дня в течение 2 недель после обработки. При учетах отмечают наличие погибших личинок в обработанном субстрате, а также появление новых кладок и развитие личинок в обработанном и новом субстрате. Эффективным считают средство, которое обеспечивает гибель 98-100% личинок (куколок) в течение 5 суток.

При изучении эффективности регуляторов развития через 24 часа после обработки субстрата отбирают не менее 3 проб – каждую с участка размером 20×40 см, содержащих куколок. Пробы переносят в лабораторию и содержат при температуре 23-25°С в течение 10 суток, подсчитывая количество вылетевших мух. Контролем служат пробы, взятые из необработанного субстрата. Средство считают эффективным, если оно обеспечивает гибель 98% куколок.

Контактную активность инсектицидов для окрыленных мух определяют при обработке нежилых помещений различного типа, куда происходит постоянный залет мух: мусорокамер, подсобных комнат пищевых объектов, помещений туалетов и т.п. В помещениях выборочно орошают поверхности суспензиями (эмульсиями, растворами) средств в концентрациях, отобранных при лабораторных экспериментах и обеспечивающих полную гибель мух. В одном населенном пункте обрабатывают не менее трех объектов.

Обработку поверхностей проводят из распыливающей аппаратуры, орошая места концентрации мух (стены около оконных рам, дверей, оконные стекла, плафоны и др.), но не более 10% поверхностей стен помещения. Норма расхода жидкости для не впитывающих жидкость поверхностей составляет 50 мл на 1 $м^2$, для впитывающих – 100 мл на 1 $м^2$. Расчет проводят по количеству ДВ на 1 $м^2$.

За сутки до обработки в помещениях проводят учет численности мух с помощью листов (лент) липкой бумаги или сахарных приманок с сильно действующим кишечным инсектицидом. Непосредственно перед обработкой проводят визуально учет численности мух, подсчитывая среднее (из трех подсчетов) число насекомых на 1 $м^2$ поверхности стены. Липкие листы размером 25×30 см раскладывают из расчета 1 лист на 10 $м^2$ пола.

Результаты обработки учитывают по числу погибших и живых мух в помещениях в утренние часы 2 раза в неделю в течение 3-4 недель. После каждого учета погибших мух удаляют из помещения.

Эффективным считают инсектицид, который обеспечивает гибель более 95% мух в течение 3 часов и сохраняет остаточное инсектицидное действие на обработанных поверхностях в течение 10 дней.

С целью установления кишечной активности инсектициды изучают в виде жидких и сухих приманок. Для приготовления жидких приманок используют 10% сахарный сироп, в котором растворяют необходимое количество инсектицидного средства. Емкости, содержащие по 50-100 мл приманки (которой пропитывают вату, фильтровальную бумагу), расставляют на подоконниках, в закрытых витринах магазинов и т. п. из расчета 1 емкость на 10 $м^2$ площади пола. По мере высыхания в них добавляют воду до ранее отмеченного уровня, чтобы сохранить необходимую концентрацию инсектицида.

Для приготовления сухих приманок используют 40-60% растворы сахара и необходимое количество инсектицида. Раствор наносят кистью полосами шириной 3-4 см по границе оконного стекла и на другие невпитывающие поверхности из расчета 100 мл раствора на помещение площадью 50 $м^2$. Гранулированные формы пищевых приманок раскладывают на подложки, которые расставляют в местах наибольшего скопления мух согласно Инструкции по практическим испытаниям средства.

Учет эффективности приманок проводят через сутки и далее 1 раз в 5-7 суток в течение месяца. Если приманки сохраняют эффективность и далее, учеты проводят 1 раз в 2 недели в течение 3 месяцев. При учете подсчитывают число погибших мух в сосуде с приманкой и в радиусе 50 см от него и отмечают наличие летающих мух в помещении в утренние часы до начала залета новых насекомых. Дополнительно 1 раз в 5 дней проводят учет эффективности приманочного метода с помощью лент (листов) липкой бумаги, размещаемых из расчета 1 лента (лист) на помещение площадью 20 $м^2$.

Показатели эффективности.

Эффективными считают жидкие приманки, которые обеспечивают гибель 95% мух в помещениях в течение 3 недель, сухие – гибель 95% мух в помещениях в течение 2 месяцев.

Изучение эффективности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках, предназначенных для уничтожения летающих насекомых.

Изучение инсектицидной активности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках по отношению к комнатным мухам проводят в квартирах, а также в объектах общественного назначения, не менее чем в 10 помещениях. За сутки до проведения обработки в помещениях учитывают численность мух с помощью листов (лент) липкой бумаги или сахарных приманок. Визуальный учет численности мух проводят непосредственно перед обработкой.

Средство из упаковки распыляют в воздух при закрытых дверях и окнах. Обработку помещения начинают с противоположного от входа конца, постепенно отступая к входной двери. Сняв с упаковки колпачок и нажимая на распылительную головку, направляют струю аэрозоля в воздух и места скопления насекомых, передвигая упаковку вдоль обрабатываемого участка на расстоянии 50 см от поверхности. Время распыления средства из упаковки зависит от содержания пропеллента, типа распылительной головки и указано в Инструкции по проведению испытаний средства. Через 15 мин. после обработки помещение проветривают сквозным потоком воздуха. В зависимости от состава средства, время обработки помещения и его проветривания может меняться.

Контроль эффективности действия средства проводят визуально через 15 мин. после его применения, затем через 6 и 24 часа. При проверке отмечают острое действие препарата и возможное остаточное

действие – время, в течение которого происходит гибель мух, залетающих в обработанное помещение. Контроль проводят путем осмотра помещения, отмечая погибших и парализованных мух, а также путем опроса населения.

Показатели эффективности.

Средство считают эффективным, если в течение 15 мин. зарегистрирована полная гибель насекомых в обработанном помещении.

Изучение эффективности средств в аэрозольных и беспропеллентных упаковках, предназначенных для уничтожения нелетающих насекомых.

Изучение инсектицидной активности средств в аэрозольных или беспропеллентных упаковках для нелетающих насекомых проводят в квартирах и в объектах общественного назначения, не менее, чем в 10 помещениях для каждого вида насекомых. За сутки до проведения опытных работ объект обследуют с целью установления степени его заселенности насекомыми, используя методы и средства, изложенные выше.

Средство распыляют при открытых окнах и форточках. Сняв с упаковки колпачок, слегка нажимают на распылительную головку и наносят средство на места, где обнаружены скопления насекомых или места их возможного обитания. При этом упаковку (баллон) держат на расстоянии 20 см от поверхности, продвигая его вдоль обрабатываемых участков. Норма расхода инсектицида составляет 10-20 г на $м^2$ обрабатываемой поверхности.

При обработке против постельных клопов орошают места обнаружения клопов: кровати, диваны, плинтусы, места отхождения обоев, щели в стенах, тыльные стороны картин, ковров. Не допускают

попадания инсектицида на полированные поверхности. После окончания обработки помещение проветривают сквозным потоком воздуха в течение не менее 30 мин.

Контроль эффективности средства проводят сразу после обработки объекта, далее через сутки, одну или две недели, а при необходимости и в более поздние сроки после дезинсекции. При этом устанавливают заселенность объекта насекомыми, используя те же градации, что и при предварительном учете заселенности, реакцию насекомых на средство (быстро ли активизируют аэрозоли выход насекомых из укрытий), сроки наступления паралича и гибели насекомых.

Показатели эффективности.

Инсектицид считают эффективным, если в течение 1 недели после обработки активные насекомые в помещении не обнаружены.

Изучение эффективности приманочных станций в отношении муравьев в натурных условиях.

В городских условиях натурные эксперименты проводят в помещениях, в которых визуально отмечали муравьев. Приманочные станции устанавливают в местах наибольшего скопления (рядом с муравьиным гнездом) или на путях регулярного интенсивного передвижения насекомых – муравьиные «дорожки»). Учеты передвигающихся муравьев-фуражиров проводят ежедневно, отмечая снижение и полное прекращение передвижений насекомых. Исчезновение передвигающихся муравьев-фуражиров служит косвенным свидетельством подавления колонии и гибели самки и расплода.

В условиях, приближенным к антропогенным (парники, теплицы, оранжереи, бетонные и каменные дорожки в саду, фундаменты

строений), а также в загородных домах (особенно на верандах, террасах, в банях) часто можно отметить черных садовых муравьев и муравьев M. rubra, перемещающихся из открытой природы. Приманочные станции устанавливают аналогичным образом – в местах наибольшего скопления и перемещения насекомых с учетом конкретного места (между цветочными вазонами и контейнерами, между кирпичами в фундаменте, в щелях между бревнами, под бетонными плитами и т.д.), отмечая ежедневно снижение численности муравьев-фуражиров и в конечном счете – гибель колонии.

Изучение эффективности гелей и паст в отношении муравьев в натурных условиях.

Натурные эксперименты проводят в помещениях, в которых были обнаружены муравьи. Гель наносят в виде пунктирных линий (штрихи, капли) вдоль плинтусов, в щели, трещины и другие места возможного обитания и перемещения муравьев. Возможно использовать пасту (гель) в виде приманок на пластиковой подложке, которые устанавливают в местах скопления (рядом с муравьиным гнездом) или интенсивного передвижения муравьев («дорожки» рабочих особей).

Гели, содержащие инсектициды острого действия (предназначенные для ряда ползающих насекомых) оказывают губительное воздействие на самих муравьев-фуражиров. Гели, предназначенные для уничтожения только муравьев, позволяют рабочим особям муравьев выполнить функцию фуражиров и перенести отравленную приманку в гнездо с самкой и расплодом. В результате обмена кормом между муравьями погибают самки, откладывающие яйца, и в конечном счете вся семья. Учеты интенсивности перемещения муравьев отмечают ежедневно до полного его прекращения.

Изучение эффективности инсектицидных средств по отношению к имаго комаров.

В населенном пункте выбирают помещения, в которых концентрируются малярийные комары рода Anopheles (хлева, сараи, жилые комнаты и др.). До обработки проводят учет численности комаров.

Участки помещения, являющиеся дневками комаров обрабатывают рабочими растворами средства в норме расхода 100 мл на 1 $м^2$. В одном населенном пункте каждым препаратом обрабатывают не менее 3 помещений в концентрациях, отобранных при лабораторных испытаниях.

Эффективность инсектицида определяют либо визуально, подсчитывая на следующий день после обработки и затем каждые 3-5 дней количество погибших комаров в помещениях, либо с помощью прозрачных пластмассовых конусов, прикрепленных к обработанным поверхностям липкими лентами В каждый конус с помощью эксгаустера помещают 10-20 комаров на 30 мин. После этого комаров из конусов переносят в чистый садок и оставляют на сутки. В садки помещают вату, смоченную водой. Такие испытания проводят первый раз через сутки после обработки и затем раз в 7-10 суток вплоть до того, как гибель комаров снизится до 70%.

Контрольными являются помещения, не обработанные инсектицидом. В этих помещениях также ставят конуса, потому что необходимо учитывать травмы комаров при посадке их в конуса и пересадке в садки эксгаустером (сравнение гибели в опыте и контроле).

Показатели эффективности.

Эффективными считают средства (их концентрации), обеспечивающие гибель 100% комаров в течение первых 3-4 недель

после обработки и не менее 95% в течение последующих сроков наблюдения.

Для обработки отдельных очагов (по показаниям) могут быть использованы средства, не имеющие длительного остаточного действия, обеспечивающие 100% гибели комаров в течение 5-7 суток после обработки.

При изучении степени раздражимости комаров к изучаемому средству в обработанное помещение выпускают 100-200 комаров и в течение часа наблюдают за их поведением. Если комары садятся на обработанные поверхности и гибнут, не обнаруживая признаков возбуждения, то раздражимости нет, и инсектицид может быть рекомендован для применения. Если комары беспокойны и пытаются вылететь из обработанного помещения, то раздражимость имеется, и изучаемый инсектицид в практику противомалярийных обработок можно рекомендовать только после повторного испытания и подтверждения отсутствия раздражимости комаров.

При изучении эффективности инсектицидов по отношению к имаго комаров рода Culex обрабатывают 2-3 подвала с высокой численностью комаров (более 100 экз./м^2) концентрациями, отобранными при лабораторных испытаниях и норме расхода 100 мл/м^2. Через сутки проводят учет численности комаров, а также определяют действие инсектицида на стенах подвала с помощью конусов по описанной выше методике. Комаров из конусов помещают в садки, учет их гибели проводят через 24 часа. Следующие учеты численности комаров и опыты с конусами проводят раз в 7-10 суток вплоть до того, когда препарат будет обеспечивать гибель менее 70% комаров. Эффективными считают инсектициды, обеспечивающие 100% гибель комаров в течение первых двух недель после обработки и не

менее 90% гибели в последующий месяц. В отдельных объектах (по показаниям) могут быть использованы инсектициды с коротким остаточным действием на обработанных поверхностях (5-7 суток).

Изучение эффективности инсектицидов по отношению к личинкам комаров.

Средства испытывают не менее, чем в трех концентрациях в водоемах площадью не менее 1-5 $м^2$. Для определения эффективности одной концентрации подбирают не менее трех водоемов одного типа. Рабочими растворами или порошками из опрыскивающей или распыливающей аппаратуры обрабатывают поверхность водоема из расчета 100 мл (г) на 1 $м^2$. Гранулы равномерно разбрасывают вручную из расчета 20-30 г на 1 $м^2$. Нормы расхода инсектицида рассчитывают в граммах ДВ на 1 $м^2$, если глубина водоема не превышает 20 см; если же глубина водоема больше, то расчет проводят на объем воды в граммах ДВ на 1 $м^3$.

Эффективность обработки оценивают путем сравнения численности личинок комаров до и после обработки через 1, 2, 5, 7 и 14 суток в обработанном и контрольном водоемах. Оценку полученных результатов проводят по формуле 3.

Учет численности личинок разных возрастов проводят стандартным сачком (диаметр – 20 см, глубина – 25 см) или кюветой с пересчетом числа личинок каждого возраста на 1 м2. Пробы берут не менее, чем в 10 местах равномерно по всей площади водоема. В период испытаний в водоемах регистрируют температуру, pH воды, степень зарастания водоема растительностью, степень проточности, загрязненность воды органическими веществами.

Остаточное действие средств определяют на личинках комаров инсектарной культуры. Для этого из обработанного водоема набирают

в 0,5 л емкости по 250 мл воды, в которую помещают по 25 личинок II-III возраста. Учет погибших личинок проводят через 1 и 2 суток. Каждые 5-7 суток опыт повторяют вплоть до того, как число личинок, погибших в воде, взятой из обработанного водоема, будет ниже 70%. Одновременно ставят контроль. Средство считают эффективным, если в течение 1-2 суток он обеспечивает 100% гибель личинок в водоеме.

Изучение эффективности инсектицидных средств в специальной аэрозольной упаковке, предназначенных для обработки осиных гнезд, в натурных условиях.

Специальная аэрозольная упаковка снабжена головкой, которая обеспечивает струю аэрозоля длиной до 5 м.

Необходимо соблюдать следующие условия и меры предосторожности при обработке осиных гнезд: Не рекомендуется проводить обработку одному испытателю. Для обработки гнезд благоприятны прохладные дни, так как осы активнее и агрессивнее в теплую погоду. Наиболее подходящее время для обработки гнезд – раннее утро (перед восходом солнца), когда активность ос наименьшая, или после захода солнца в сумерки, когда почти все рабочие особи ос находятся в гнезде. Это требование также согласуется с экологическим регламентом – проводить обработки инсектицидами ранним утром и поздним вечером во избежание возможного контакта пчел с ядами. Указанное время суток также является фактором, лимитирующим возможный нежелательный контакт ос с людьми и животными.

При обработке не следует использовать карманный фонарик или другой источник света, так как это может спровоцировать активность ос. Проводящий обработку должен надеть защитную одежду, хорошо закрывающую голову и шею, кисти рук (плащ или куртку из водоотталкивающей ткани с капюшоном, плотные перчатки). Не

следует перед обработкой пользоваться парфюмерией и употреблять спиртные напитки, так как осы агрессивно реагируют на резкие запахи.

Испытатели находят осиное гнездо, которое расположено в пределах их досягаемости. Один из испытателей обрабатывает гнездо, не снимая его с места прикрепления, с расстояния не менее 1,5 м в течение 2-4 сек., что соответствует норме расхода 40 г/м^2. Затем второй испытатель быстро надевает на гнездо герметичный прозрачный полиэтиленовый мешок и плотно завязывает его. Учет эффективности обработки проводят через 1 ч и 12 ч по появлению живых или погибших ос в мешке.

Изучение эффективности специальных аттрактивных и аттрактивно-инсектицидных приманок, предназначенных для отлова и уничтожения ос, в натурных условиях.

Приманки, предназначенные для отлова и уничтожения ос подразделяются на два типа:

а) аттрактивные приманки на основе углеводов без инсектицида – такие приманки помещаются в ловушки (например, бутылки с водой), из которых насекомые, привлеченные аттрактантом, не могут выбраться наружу; несколько ловушек с приманкой размещают в помещении или снаружи строения, и учитывают попавших в ловушку ос;

б) приманки на основе белкового корма, содержащие инсектицид замедленного действия (например, авермектины) или регулятор развития насекомых – отравленный белковый корм насекомые относят в гнездо и скармливают личинкам; распространение отравленного корма происходит внутри гнезда посредством трофаллаксиса.

Показатели эффективности:

а) инсектицидные средства в специальной аэрозольной упаковке, предназначенные для обработки осиных гнезд: гибель насекомых через 1 ч и 12 ч составляет не менее 100%;

б) приманки на основе углеводородов с аттрактантом, помещенные в ловушку: уловистость через 2 суток не менее 10 особей;

в) приманки на основе белкового корма, содержащие инсектицид: гибель колонии через 3-4 недели.

2.8.3. Изучение эффективности регуляторов развития насекомых в натурных условиях

Средства испытывают не менее, чем в трех концентрациях на водоемах площадью водной поверхности от 1 до 5 м^2. Для определения эффективности одной концентрации подбирают не менее трех водоемов одного типа.

Рабочими растворами или порошками из опрыскивающей или распыливающей аппаратуры обрабатывают поверхность водоема из расчета 100 мл (г) на 1 м^2. Гранулы равномерно разбрасывают вручную из расчета 20-30 г на 1 м^2. Нормы расхода РРН рассчитывают в граммах ДВ на 1 м^2, если глубина водоема не превышает 20 см; если же глубина водоема больше, то расчет проводят на объем воды в граммах ДВ на 1 м3.

Эффективность обработки оценивают ежедневно путем сравнения численности и внешнего вида личинок комаров до и после обработки до получения явных эффектов нарушения линьки в обработанных водоемах.

Учет численности личинок разных возрастов проводят стандартным сачком (диаметр – 20 см, глубина – 25 см) или кюветой с пересчетом числа личинок каждого возраста на 1 м2. Пробы берут не

менее чем в 10 местах равномерно по всей площади водоема. В период испытаний в водоемах регистрируют температуру, pH воды, степень зарастания водоема растительностью, степень проточности, загрязненность воды органическими веществами.

Остаточное действие РРН определяют на личинках комаров инсектарной культуры. Для этого из обработанного водоема набирают в 0,5 л емкости по 250 мл воды, в которую помещают по 25 личинок 1-2 возраста в случае с ИСХ и 4 возраста при испытании АЮГ. Учет погибших личинок проводят ежедневно. Каждые 5-7 суток опыт повторяют вплоть до того, как число личинок, погибших в воде, взятой из обработанного водоема, будет ниже 70%. Одновременно ставят контроль.

Показатели эффективности.

Средства считают эффективными, если в течение 25-30 суток они обеспечивают нарушения линьки или гибель куколок при окрылении в воде, взятой из обработанного водоема.

2.8.4. Изучение эффективности акарицидных (инсектоакарицидных) средств, предназначенных для обработки природных биотопов с целью уничтожения иксодовых клещей

Изучение акарицидной активности средств проводят на территории, где отмечена высокая численность клещей (не менее 20 экз. на 1 км маршрута при стандартном учете численности клещей флагом) в период подъема или пика численности. Для таёжных клещей этот период приходится на середину апреля – первую половину июня. В период падения численности клещей испытания акарицидов не проводят.

Изучение эффективности концентратов эмульсий и смачивающихся порошков. Для испытания препаратов на выбранной территории размечают квадратные делянки размером 10×10 м, площадью 0,01 га. Три делянки должна быть контрольными и по 3 делянки на каждую испытуемую норму расхода средства.

По периметру каждой делянки намечают нейтральную полосу шириной 1 м. Вместе с нейтральной полосой размер каждой делянки равняется 12×12 м, площадь около 0,0144 га. С целью увеличения количества клещей на делянке в центр каждой из них подсаживают по 30 клещей (15 самок и 15 самцов), собранных на флаг на территории, не подвергавшейся обработке акарицидами. Опыт начинают на следующие сутки после разметки площадок и подсадки клещей.

Обрабатывают акарицидом каждую делянку, включая нейтральную полосу. Контрольную делянку располагают так, чтобы исключить попадание на нее инсектицидов (занос ветром во время обработок, стоком воды при дождях). Обработку делянок проводят испытуемым инсектицидом в концентрациях, рекомендованных в проекте Инструкции по применению. Для обработки используют любые опрыскиватели, обеспечивающие мелкокапельное распыление. Обработку проводят так, чтобы обеспечить равномерное покрытие испытуемым препаратом всей площади делянки.

Учеты клещей проводят одновременно на контрольных и опытных делянках перед обработкой, на 3 сутки после обработки, а затем еженедельно в течение 1-2 месяцев до полного исчезновения клещей на контрольных делянках. Учёты проводят в утренние часы после схода росы. Если погода пасмурная, без заметного повышения полуденных температур, учеты можно проводить и днем. Для учета на опытных делянках и в контроле используют разные флаги, которые должны быть

соответственно маркированы. На каждой контрольной делянке при первом учёте должно быть зарегистрировано не менее 10 клещей. Отсутствие на ней клещей или их меньшее количество свидетельствует о плохом качестве выполнения опытов и должен быть рассмотрен вопрос о повторении опыта на другой территории. На каждой делянке учет проводят челночным ходом так, чтобы суммарная длина маршрута составляла не менее 0,1 км, желательно – 0,2 км (10-20 параллельных ходов на площадке со стороной 10 м). Оценку полученных результатов проводят по формуле 8. Расчет эффективности действия акарицида проводят для каждого срока контрольного обследования. Изменение показателей эффективности по сезону служит критерием длительности эффекта обработок.

Показатели эффективности: эффективность средства на 3 сутки – не менее 95%, длительность такого действия должна быть не менее 30 суток.

2.8.5. Изучение эффективности инсектоакарицидных средств, предназначенных для защиты людей от нападения комаров, мошек и других летающих насекомых

Оценку эффективности инсектоакарицидных средств выполняют в природных условиях в отношении комаров природных популяций.

Перед опытами 3 испытателя проводят учет интенсивности нападения комаров по методу А.В. Гуцевича «на себе» (учетная единица – количество посадок комаров на обнаженное предплечье испытателя за 20 мин.). Для данных опытов необходима высокая (от 80 до 120 посадок за 20 мин. на обнаженное предплечье испытателя) численность нападающих комаров. При такой численности учитывать следует посадки комаров за 5 мин., а затем пересчитывать полученные

данные на 20 мин. Запрещено выполнять данные опыты в природных очагах трансмиссивных инфекций, возбудителей которых переносят комары.

Подготовительный этап.

Из чистой белой хлопчатобумажной бязи изготавливают 3 контрольных теста размером 70,0×30,0 см. Контрольные тесты не должны соприкасаться с опытными тестами или руками, загрязненными инсектоакарицидами! Для подготовки опытных тестов на стене в хорошо проветриваемом помещении закрепляют чистую белую хлопчатобумажную бязь размером 70×70 см. Изучаемым средством в виде аэрозоля равномерно обрабатывают эту ткань, по норме расхода изучаемого средства, рекомендованной для его применения (как правило для аэрозольных и беспропеллентных аэрозольных упаковок – 20 г/м2 поверхности).

Оценку эффективности средства проводят 3 испытателя, одетые в чистую одежду из непрокусываемой комарами ткани. Лица испытателей должны быть защищены сетками на передней части капюшонов. Испытателей размещают в природном биотопе (у каждого испытателя обнажены только предплечья, кисти рук).

Контрольными тестами покрывают всю поверхность кисти и предплечья каждого испытателя. Для закрепления ткани используют канцелярские резиновые кольца. Ткань теста должна без натяжения прилегать к предплечью, на кисти руки допустимо натяжение ткани. Регистрируют количество укусов комаров через ткань контрольных тестов за 10 мин. После опыта с контрольными тестами аналогично проводят эксперименты с опытными тестами, регистрируя количество укусов комаров через ткань за 10 мин.

Коэффициент защитного действия ($КЗД_{комары}$ в процентах) рассчитывают по формуле 19.

Каждый опыт проводят на трех тестах разные испытатели (повторности). Рассчитывают средний показатель эффективности средства ($КЗД_{комары}$) для комаров и его статистическую ошибку. Между опытами тесты подвешивают в лаборатории при комнатной температуре 22±2ºС, относительной влажности 50-70% и естественном освещении.

Испытания тестов начинают через 1 сутки после обработки тестов и повторяют для установления длительности защитного действия через 7, 14 и более суток до снижения показателя $КЗД_{комары}$ ниже нормативного. Частоту испытаний определяет испытательная лаборатория (центр). Длительность инсектицидного действия на ткани указывают при описании свойств данного средства.

Показатель эффективности: $КЗД_{комары}$ – не менее 95%.

2.8.6. Изучение защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды

Изучение защитных свойств тканей, содержащих инсектоакарициды, в отношении комаров, мошек и других летающих насекомых также проводят в природных условиях аналогично описанному выше методу. Из изучаемой ткани площадью 2 $м^2$ вырезают из разных мест 3 опытных теста такого же размера, что и контрольные тесты.

Показатель эффективности: $КЗД_{комары}$ – не менее 95%.

2.8.7. Изучение эффективности репеллентных средств в отношении кровососущих насекомых в натурных условиях

Изучение защитного действия репеллентных средств в отношении летающих кровососущих насекомых, предназначенных для нанесения на кожу (кремы, лосьоны, эмульсии, салфетки, карандаши, аэрозоли). Испытания эффективности репеллентных средств от летающих кровососущих насекомых проводят в природных биотопах с высокой и средней численностью разнообразных нападающих на человека кровососов для определения спектра защитного действия. Репеллентное средство наносят на всю поверхность обнаженного предплечья или голень испытателя в норме расхода 0,1 мл (г) на 100 $см^2$ кожи. Предплечье второй руки (голень второй ноги) обрабатывают в той же норме расхода эталоном предполагаемой категории эффективности. В качестве эталона используют ДЭТА в концентрациях, указанных в 2.5.1. Регистрируют КОД через 15 мин. после нанесения средства.

Критерием окончания защитного действия служит регистрация 3 укусов насекомых в предплечье или голень одного испытателя за 3 мин. Контрольный испытатель во время испытаний учитывает и отлавливает кровососущих насекомых, производит все записи, измеряет температуру и влажность воздуха, направление и силу ветра, отмечает состояние погоды и пр.

Испытание каждого средства проводят не менее 10 раз при различных условиях (разные биотопы, погодные условия, время суток). На основании полученных данных высчитывают КОД и показатель ДРД по отношению к различным группам кровососущих насекомых (комары, мошки, мокрецы, слепни), который выражают в часах. В качестве дополнительных возможно проведение испытаний защитных свойств репеллентных средств при разной физической нагрузке испытателей.

Показатели эффективности.

КОД – 100 %, длительность репеллентного действия в отношении комаров в часах в соответствии с категориями эффективности (см. 2.5.1.).

Изучение защитного действия в отношении кровососущих насекомых и клещей репеллентных средств в виде концентратов эмульсий, аэрозольных и беспропеллентных упаковок, предназначенных для нанесения на одежду.

Обработку одежды (костюмы, наголовные сетки и т.д.) проводят в соответствии с рекомендованным способом применения (замачивание в эмульсии, распыление эмульсии, распыление из аэрозольной упаковки). Испытания проводят специалисты, одетые в обработанную одежду, в местах с высокой численностью гнуса и клещей. Необработанная одежда не должна защищать от укусов насекомых. Эффективность защитного действия пропитанной репеллентами одежды определяют по соотношению числа кровососов, нападающих за единицу учетного времени (20 мин.) на испытателя в обработанной и контрольной (необработанной) одежде. Острое отпугивающее действие определяют через сутки после обработки. В дальнейшем испытания проводят один раз в 3-5 дней вплоть до утраты одеждой защитных свойств. Длительностью защитного действия репеллентного средства является период времени в сутках пока защитные свойства сохраняются не менее чем на 90%.

Показатели эффективности.

КОД – 100 %, длительность репеллентного действия в отношении комаров в часах в соответствии с категориями эффективности (см. 2.5.1.).

2.8.8. Методы изучения эффективности репеллентных средств в отношении муравьев в натурных условиях

Оценку репеллентной активности проводят на муравьях рода Formica в натурных условиях в период их активности (весна-осень). Каждое средство испытывают не менее трех испытателей не менее чем в трех повторностях (всего 9 повторностей).

Метод изучения эффективности репеллентных средств, предназначенных для защиты от муравьев, при нанесении на одежду.

Из хлопчатобумажной бязи изготавливают тестовые штанины площадью 0,5 м^2 и обрабатывают их средством из расчета 20 г/м^2.

При испытаниях обработанную штанину надевают на ногу испытателя, заправляя в носок, чтобы избежать попадания муравьев под одежду и ногу в обуви ставят на то место около муравейника, где наблюдается скопление насекомых. Муравьи заходят на обувь, после чего поднимаются вверх на носок к обработанной штанине и ползут по ней вверх. Регистрируют число муравьев, проползших отрезок, обработанный репеллентным средством, длиной 50 см.

Рассчитывают КОД по формуле 12, который равен доле муравьев (в процентах), не проползших обработанную зону от числа муравьев в опыте. Испытание репеллентной активности проводят первый раз после полного высыхания ткани (примерно через 1 час после обработки) и затем через 1, 2, 3, 5 суток и далее. Для определения длительности репеллентного действия испытания повторяют до тех пор, пока КОД сохраняется не менее 70%. В промежутках между испытаниями штанины подвешивают в лаборатории при комнатной температуре 22±2ºС, относительной влажности 60-70% и естественном освещении.

Метод изучения эффективности репеллентных средств, предназначенных для защиты от муравьев, при нанесении на кожу.

К испытаниям допускаются только средства, имеющие подтверждение безопасности их применения на кожу людей. Изучаемое средство наносят на обнаженную голень испытателя в норме расхода 0,1 мл (г) на 100 $см^2$ поверхности кожи. Испытатели должны избежать попадания муравьев под одежду: надеть носки с плотной резинкой закатать брюки так, чтобы они плотно прилегали к ноге выше колена. Ногу в обуви ставят на то место около муравейника, где наблюдается скопление насекомых. Муравьи заходят на обувь, после чего поднимаются вверх на носок к обработанной голени и ползут по ней вверх. Регистрируют число муравьев, проползших отрезок, обработанный репеллентным средством (от носка до колена). Испытания начинают сразу после нанесения средства. С целью определения длительности репеллентного действия (ДРД) проводят повторение опыта через каждые 30 мин.

Рассчитывают КОД по формуле 12, который равен доле муравьев (в процентах), не проползших обработанную зону от числа муравьев в опыте. Для определения длительности репеллентного действия испытания повторяют до тех пор, пока КОД сохраняется не менее 70%.

2.8.9. Изучение защитных свойств специальной одежды для защиты от кровососущих насекомых и клещей

Испытания проводят в соответствии с ГОСТ Р 12.4.296–2013 ССБТ. Одежда специальная для защиты от вредных биологических факторов (насекомых и паукообразных) Общие технические требования. Методы испытаний.

2.8.10. Практические испытания инсектицидных, акарицидных и репеллентных средств

Практические испытания – испытания дезинфекционных средств, проводимые силами санитарно-эпидемиологической и дезинфекционной служб на обычных объектах дезинфекционных мероприятий с использованием имеющегося в распоряжении служб оборудования.

На проведение практических испытаний требуется разрешение органа здравоохранения, отвечающего за эпидемиологическую обстановку в стране. В настоящее время такое разрешение даёт Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Практические испытания проводят силами практических организаций в разных регионах, отличающихся климатическими, географическими условиями, видовым составом и сезонной динамикой численности членистоногих и др. При проведении этих испытаний определяют эффективность средства по отношению к доминирующим видам членистоногих в зависимости от климатических условий региона и уровня чувствительности природных популяций членистоногих к инсектицидам, определяют длительность остаточного действия средства при использовании его в разных климатических зонах, пригодность для обработки серийной стандартной аппаратурой, возможность рекомендовать его для использования населением

Практические испытания проводят в соответствии с утвержденными Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Программой проведения практических испытаний и Инструкцией по их проведению, разработанными для каждого испытуемого средства специалистами

(энтомологами, биологами, паразитологами, врачами, гигиенистами). В Инструкцию должны быть включены общие сведения о средстве (состав полностью, класс опасности, для каких целей предназначено); методика обработки; рабочие концентрации и нормы расхода препарата по отношению к каждой группе членистоногих, для которых средство предназначено; методика учета эффективности обработок; меры предосторожности при работе со средством и меры первой помощи при случайном отравлении.

К Инструкции прилагают формы необходимой документации (акты, анкеты, опросные листы и др.), которые заполняют специалисты практических организаций, непосредственно руководившие испытаниями препарата. В анкетах, кроме эффективности средства, отмечают наличие или отсутствие побочных явлений у людей, проводивших обработки, пользовавшихся средством или находившихся в обработанных объектах.

Обобщение и анализ материалов практических испытаний проводит организация, ответственная за подготовку и проведение таких испытаний.

Подготовленные отчеты по результатам практических испытаний с приложением подлинников Актов организаций, проводивших испытания представляются в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Меры предосторожности при работе с природными популяциями членистоногих. Многие членистоногие являются переносчиками возбудителей природноочаговых трансмиссивных болезней (малярия и чума, вирусные энцефалиты и желтая лихорадка, трипаносомозы и риккетсиозы, туляремия и др.). В связи с этим при сборе и последующей

работе с природными популяциями членистоногих необходимо соблюдать меры предосторожности!

При работе в природных биотопах, расположенных в природных очагах трансмиссивных инфекций, персонал должен быть проинструктирован о необходимых мерах предосторожности в отношении членистоногих. Обязательно проведение соответствующих прививок и наличие необходимых средств экстренной профилактики. При работе с членистоногими необходимо работать в резиновых перчатках и халатах, эксгаустеры должны быть снабжены грушами или ватными фильтрами.

При работе с иксодовыми клещами рабочий стол должен быть застелен белой бумагой и на нем не должно быть лишних предметов. Исследователю не следует одновременно осуществлять наблюдение за несколькими клещами или допускать исчезновение клеща из вида. Люди, работающие с клещами, являющимися переносчиками вируса клещевого энцефалита, должны быть привиты от этой инфекции.

Членистоногих, оставшиеся в живых после проведения эксперимента, уничтожают (заваривают кипятком или замораживают) или сохраняют для дальнейших исследований в соответствии с требованиями. При необходимости сбора коллекций, членистоногих помещают в 96% этиловый спирт).

2.9. Приложения

Приложение (рекомендуемое)

Показатели эффективности средств дезинсекции

№ п/п	Вид продукции	Исследуемые показатели	Нормативы
1.	Клейкие ловушки без инсектицидов в виде домиков для борьбы с тараканами	Средняя уловистость, % на 7 сутки на 14 сутки Ресурс ловушки Срок действия, сутки	 не менее 90 не менее 95 1 рыжий таракан/см^2 не менее 15
2.	Клейкие ловушки в виде лент, листов, палочек для борьбы с летающими насекомыми (мухи, моль)	Средняя уловистость на 2 сутки, % Ресурс ловушки Срок действия, сутки	 не менее 95 1 комнатная муха/см^2 не менее 15
3.	Клейкие ловушки для отлова огневок (пищевая моль) и платяной моли	Средняя уловистость на 2 сутки, %	не менее 70
	Клей для отлова насекомых	При норме расхода 1,50 г/дм^2 Средняя уловистость на 2 сутки, % Ресурс клея	 не менее 95 1 комнатная муха/см^2
	Инсектицидные средства		
	Инсектицидные пищевые приманки для борьбы с тараканами и муравьями (в виде контейнеров, таблеток, шариков, брикетов, гранул, порошка, пасты, гелей, пены и др.):		
	а) ДВ — ФОС, карбаматы, пиретроиды, фенилпиразолы (фипронил);	Острое действие: Гибель, % на 2 сутки	 не менее 70*
	б) ДВ — имидаклоприд (гель)	Острое действие: Гибель на 3 сутки, %	 не менее 70
	в) ДВ — гидраметилнон или другой аминогидразон, сульфторамиды, неоникотиноиды (тиаметоксам, ацетамиприд), авермектины;	Острое действие: Гибель на 5 сутки, %	 не менее 70
	г) ДВ — борная кислота, бура (гель)	Острое действие: Гибель на 5 сутки, %	 не менее 70
	д) ДВ — борная кислота, бура (жидкие приманки)	Острое действие: Гибель на 5 сутки, %	 не менее 70
	Инсектицидные пищевые		

	приманки для борьбы с синатропными мухами (жидкие, сухие сахарные, гранулированные, пластины, гели и др.)		
	а) ДВ — ФОС (кроме хлорофоса), пиретроиды, неоникотиноиды;	Острое действие: Гибель мух через 24 часа, %	100
	б) ДВ — хлорофос	Острое действие: Гибель мух через 24 часа, %	не менее 80
	Инсектицидные средства в аэрозольных упаковках с пропеллентами: для борьбы с летающими насекомыми (мухи, комары и др.)	Острое действие на мух: C15, мг/м3 Q15, мг/м3 $КТ_{50}$, мин	не более 15 не более 1000 не более 10
	Инсектицидные средства в аэрозольных и беспропеллентных упаковках для борьбы с нелетающими насекомыми (тараканы, клопы, муравьи, блохи)	Острое действие для тараканов: Гибель тараканов, % через 10 мин через 24 часа	 не менее 30 100
		Остаточное действие: гибель тараканов через 24 часа при подсадке на 3 сутки, %	Не менее 50
	Инсектицидные пиротехнические средства (шашки, таблетки, шнуры): а) для борьбы с летающими насекомыми	Острое действие: гибель (%) после полного задымления через 2 часа	100
	б) для борьбы с нелетающими насекомыми	Острое действие при учете через 24 часа: Гибель тараканов, % Гибель блох, %	 не менее 90 100
	в) свечи для борьбы с комарами	Гибель комаров (%) при 6 мин горения через 15 мин после гашения свечи	не менее 90
	Инсектицидные спирали для борьбы с летающими насекомыми	Острое действие: $КТ_{50}$ для комаров, мин. $КТ_{50}$ для мух, мин	 Не более 7 не более 60
	Инсектицидные дусты для борьбы с нелетающими членистоногими и обработки мест посадки и выплода мух	Острое действие: Гибель тараканов, мух через 24 часа, % Остаточное действие: гибель тараканов через 24 часа при подсадке на 3 сутки , %	 100 100
	Инсектицидные карандаши, мелки, бруски для борьбы с нелетающими синантропными членистоногими	Острое действие: Гибель тараканов через 24 часа, % Остаточное действие: гибель тараканов через 24 часа при подсадке на 3 сутки, %	 100 100
	Инсектицидные концентраты эмульсий, микрокапсулированные,	Острое действие: Гибель членистоногих через 24 или 72 часа, %	 100

	смачивающиеся, или воднорастворимые, или диспергируемые порошки и таблетки, суспоэмульсии, флоу для борьбы с синантропными членистоногими	Остаточное действие: гибель тараканов через 24 часа при подсадке на 3 сутки, %	 100
	Средства для борьбы с личинками комаров: а) микробиологические б) ФОС, пиретроиды и др.	 $СК_{50}$, мг/л, % Гибель личинок через 24 часа, %	не более приведенной в ТУ 100
	Средства электрофумигирующие для борьбы с летающими насекомыми :		
	для комаров и других насекомых (кроме мух) а) с матами (пластинами) б) жидкостные в) таблетками	 $КТ_{50}$ для комаров, мин пластины жидкости таблетки Резерв мата (флакона, таблетки) для комаров, час	 не более 7 не более 4-5 не более 10 не менее указанного в НТД
	Для мух: на эмпентрине (вапортрине) и трансфлутрине: на других летучих пиретроидах	 $КТ_{50}$ для мух, мин Резерв средства для мух, час	 не более 9-12 не более 20 не менее указанного в НТД
	Фумигирующие устройства для применения на открытом воздухе фонарь со свечкой и инсектицидной пластиной)	$КТ_{50}$, мин Резерв средства	не более 2 не менее указанного в НТД
	Фумигирующие устройства для применения на открытом воздухе с фенсистемой на батарейках (попелатор)	$КТ_{50}$, мин Резерв средства	не более 2 не менее указанного в НТД
	Инсектицидные средства на основе регуляторов развития насекомых (РРН)		
	При внесении в среду обитания на основе аналогов ювенильного гормона (АЮГ) - жидкие формы - плавающие формы (брикеты, гранулы) - гранулы для борьбы с мухами	Деформированных личинок: комаров 2 (ИСХ) или 4 (АЮГ) возраста через 2-4 суток, % личинок блох через 3 суток, % комаров 2 (ИСХ) или 4 (АЮГ) возраста через 4-5 суток, % личинок мух через 4-5 суток, %	 не менее 90 не менее 95 не менее 95 не менее 95

	Пищевые приманки: - для мух с АЮГ и ИСХ - для тараканов с АЮГ и ИСХ Диски-фумигаторы с АЮГ - для тараканов	Стерильность самок Жизнеспособных яиц, % Деформированных личинок через 2-3 суток, % Деформированных личинок, % через 5-7суток Меланизированных и деформированных личинок через 2 недели	Отсутствие яйцекладок через 5 дней не более 5 не менее 95 не менее 95 Появление единичных особей
	Педикулицидные средства в разных формах для борьбы с головным, лобковым, платяным педикулезом		
	Лосьоны, концентраты эмульсий, шампуни, мыла и др. моющие средства, дусты, суспензии, кремы, гели, эмульсии и др.	Гибель имаго через 24 час, % Гибель яиц через 21 день, %	100 10-100
	Средства для импрегнации белья с целью предупреждения заражения его педикулезом	Гибель имаго и личинок при контакте60 мин. при учете через 24 часа, % Поражение имаго и личинок при контакте в течение 180 мин	100 100
	Средства борьбы с молью и кожеедами		
	Контактного действия	Острое действие: Гибель гусениц моли или личинок кожеедов через 72 часа, %	100
	Фумигационного действия	Острое действие: Гибель имаго в объеме до 100 л через 48 часов, % Нокдаун мух в объеме 10 л в течение 3-6 час не менее, % Гибель мух через 24 часа, не менее,%	100 95 80
	Репеллентного действия	КОД в ольфактометре через 24 часа, %	не менее 75
	Средства борьбы с осами		
	Инсектицидные средства в аэрозольных упаковках для распыления в воздух	Острое действие на ос (мух - тест-объект) C_{15} мг/м^3 Q_{15} мг/м$_3$ $КТ_{50}$, мин	 Не более 10 Не более 1000 Не более 10
	Инсектицидные средства различных форм для обработки гнезд	Острое действие на ос (мух, тараканов - тест-объект) при подсадке на впитывающую поверхность (через 15 мин. после обработки): Гибель, % Остаточное действие на 3 сутки, %	 не менее 100 не менее 50

	Инсектицидные пищевые приманки	Острое действие на ос (мух — тест-объект) Гибель через 24 часа, % Остаточное действие: Гибель через 3 суток , %	не менее 80 не менее 80
	Ловушки безинсектицидные с аттрактантами	уловистость через 2 суток, особи	не менее 10
	Акарицидные и инсектоакарицидные средства		
	Для защиты людей от иксодовых клещей, блох и комаров (нанесение на одежду и на изделия из ткани)	Острое действие: Для клещей $КТ_{ср}$, минуты $МВ_{ср}$, см ИСП Для блох $КБ_5$, экз. $МВ_{ср}$, см Для комаров $КЗД_{комары}$, %	 не более 5 не более 50 не более 1,1 не более 3 не более 20 не менее 95
	Для борьбы с гамазовыми и чесоточными клещами в помещениях	Острое действие: Гибель клещей через 24 часа, % Остаточное действие: Гибель клещей при подсадке на 3 сутки на невпитывающую поверхность через 24 часа, %	 100 не менее 80
	Для борьбы с клещами домашней пыли в помещениях	Острое действие: Гибель клещей через 15 мин, % через 24 часа, %	 не менее 85 100
	Для борьбы с иксодовыми клещами в природных биотопах	Острое действие: Эффективность на 3 сутки, % Длительность действия, сутки	 не менее 95 не менее 30
	Ткани, содержащие инсектоакарициды		
	Для защиты людей от иксодовых клещей, блох и комаров	Для клещей $КТ_{ср}$, минуты $МВ_{ср}$, см ИСП Для блох $КБ_5$, экз. $МВ_{ср}$, см Для комаров $КЗД_{комары}$, %	 не более 5 не более 50 не более 1,1 не более 3 не более 20 не менее 95
	Инсектородентицидные средства		
	Приманки инсектородентицидные для одновременного уничтожения блох или клещей и грызунов	Острое действие: подсадка на мышей, питавшихся приманкой в течении 3 суток, и учете через 24 часа блох или крысиных клещей напитавшихся особей, смертность, %	Не менее 80
	Репеллентные средства		
	Для нанесения на кожу	Острое действие: КОД для комаров, %	 100

		КОД для муравьев, % Длительность действия: ДРД для комаров, часы (по категориям эффективности): высшая категория 1 категория 2 категория 3 категория 4 категория	Не менее 95 4 и более 3 и более до 4 2 и более до 3 1 и более до 2 не менее 1 (при низкой численности комаров)
	Для нанесения на одежду и на изделия из ткани	Острое действие: КОД, % для комаров для блох для иксодовых клещей для муравьев	 100 95 и более 95 и более 95 и более
		Длительность действия: ДРД, сутки (по категориям эффективности): для комаров: высшая категория 1 категория 2 категория 3 категория	 20 и более 10 и более до 20 5 и более до 10 3 и более до 5
		для блох: высшая категория 1 категория 2 категория	 5 и более 3 и более до 5 2 и более до 3
		для иксодовых клещей	3 и более
		для муравьев	3 и более
	Репеллентные браслеты, наклейки и другие изделия, содержащие репелленты и предназначенные для защиты людей от нападения комаров	КЗД, %	не менее 30
	Акарицидно-репеллентные средства		
	Для защиты от иксодовых клещей и летающих кровососущих насекомых (нанесение на одежду и на изделия из ткани)	Для клещей $КТ_{ср}$, минуты $МВ_{ср}$, см ИСП Для блох $КБ_5$, экз. $МВ_{ср}$, см	 не более 5 не более 50 не более 1,1 не более 3 не более 20
		Для комаров: Острое действие: КОД, % Длительность действия: ДРД, сутки (по категориям	 100

		эффективности): высшая категория 1 категория 2 категория 3 категория	 20 и более 10 и более до 20 5 и более до 10 3 и более до 5
	Аттрактанты, феромоны		
	Для мух	КАД в садках за 3 мин, % $КАД_{мухи}$ в камерах,за 24 часа, %	не менее 50 не менее 20
	Для тараканов	КАД за 24 часа, %	 не менее 50
	Одежда для защиты людей от членистоногих		
	Для защиты людей от иксодовых клещей, блох и гнуса (летающих кровососущих насекомых)	Для клещей $КЗД_{клещи}$, % Для блох $КЗД_{блохи}$, % Для гнуса $КЗД_{гнуса}$, % Длительность защитного действия: а) одежда с постоянными защитными свойствами, годы б) одежда с временными защитными свойствами, сутки	 не менее 98 не менее 98 не менее 90 2 и более не менее 14

3. Родентологические методы исследований и критерии оценки эффективности дератизационных средств

3.1. Общие положения. Требования к экспериментальным животным и условиям их содержания

Под дератизационными средствами понимают химические и физические средства, используемые для умерщвления и отпугивания грызунов с целью снижения их численности.

К химическим дератизационным средствам относятся родентициды и их формы, синергисты и репелленты.

К физическим дератизационным средствам относятся механические устройства, умерщвляющие грызунов (давилки, капканы, клеевые ловушки) или средства отлова однократного и многократного действия, ограничивающие передвижение грызунов (живоловки), а также отпугивающие устройства (ультразвуковые и электромагнитные излучатели, электрические устройства).

Дератизационные средства и рекомендуемые способы их применения должны удовлетворять следующим требованиям:

– быть эффективными в отношении целевых видов;

– не обладать репеллентными свойствами (за исключением репеллентов);

– быть безопасными для человека и нецелевых видов животных, что предполагает наличие антидотов или соответствующих мер применения.

Дератизационные средства испытывают в лабораторных условиях и в естественных местообитаниях грызунов (в натурных условиях).

В лабораторных условиях эффективность дератизационных средств оценивают при одиночном или групповом содержании

животных. В естественных местах обитания грызунов уточняют режимы применения и эффективность дератизационных средств.

Все работы проводят в соответствии с действующими требованиями, инструкциями, утвержденными нормами и правилами, методиками содержания лабораторных животных и испытания дератизационных средств.

Требования к экспериментальным животным и условиям их содержания. Эффективность дератизационных средств определяют на лабораторных формах грызунов целевых видов – серых и черных крысах, домовых мышах, серых полевках – видах, которые являются главными объектами дератизации в населенных пунктах. В экспериментах используют потомков диких грызунов, выращенных в условиях вивария. При отсутствии в виварии лабораторных потомков диких грызунов допускаются натурные испытания в природных условиях или в условиях населенного пункта.

3.2. Методы исследований эффективности химических родентицидных средств

3.2.1.Требования к условиям эксперимента по оценке эффективности родентицидных средств. Контролируемые показатели и обработка результатов

Чистота эксперимента по оценке эффективности родентицидных средств зависит от поддержания постоянных условий содержания животных на протяжении всего опыта. Лабораторное помещение, где проводят эксперименты, должно быть изолировано от других помещений вивария, иметь естественный световой режим, комнатную температуру (20-22ºС) и стабильную относительную влажность воздуха (50-60%).

Состав и качество корма остаются постоянными на протяжении опыта. При изучении эффективности отравленных приманок в качестве контроля используют альтернативный корм, не содержащий родентицидного средства. Для этих целей используют овсяную крупу.

Определение эффективности субстанций и концентратов действующих веществ (ДВ) изучают на приготовленной стандартной отравленной приманке, используемой в качестве модели, с известной концентрацией действующего вещества. Для стандартной отравленной приманки в качестве пищевой основы применяют овсяную крупу. Стандартную приманку с определенной концентрацией ДВ готовят, смешивая зерновую основу с концентратом действующего вещества.

Необходимое количество концентрата (К) в приманке рассчитывают по формуле:

$$К = \frac{П \cdot ДВ_2}{ДВ_1}, \text{ где}$$

К – количество концентрата (г);

П – количество приманки (г);

$ДВ_1$ – содержание ДВ в концентрате (%);

$ДВ_2$ – заданное содержание ДВ в приманке (%).

Во время эксперимента животным обеспечивают свободный доступ к воде и корму. Используют водопроводную воду без постороннего запаха и привкуса с pH 6,8-7,0. Конструкция автоматических поилок исключает загрязнение воды. Кормушки с кормами подвешивают на противоположные стенки клетки – это уменьшает его загрязнение и растаскивание. Альтернативный корм и приманку раскладывают в разные кормушки по 100 г для крыс и по 50 г для мышей. Полного съедания кормов не допускают; при съедании 2/3 корма в кормушку добавляют новый, до первоначальной массы.

Кормушки ежедневно меняют местами для того, чтобы исключить привыкание грызунов к одному месту кормления.

В опыт отбирают здоровых грызунов, примерно одного возраста (2-6 месяцев) и массы тела (серые крысы 150-280 г; домовые мыши 20-30 г; серые полевки 18-28 г). Если не ставится задача специальных исследований, то в опытах не используют беременных или лактирующих самок.

Грызунов, отобранных для опытов, не обрабатывают инсектицидами, антигельминтными препаратами, места их содержания не обрабатывают дезинфектантами.

Для экспериментов используют 6 особей одного вида. При получении нечетких результатов опыты повторяют на 10 грызунах.

Перед началом эксперимента грызунов в течение 3 дней выдерживают для адаптации к новым условиям содержания и кормления. Для изучения эффективности родентицидных средств в эксперименте наблюдения проводят до момента гибели животного, но не более 3 суток для родентицидов острого действия, 10 суток – для антикоагулянтов второго поколения и ядов смешанного действия (витаминов D2 и D3) и 14 суток – для антикоагулянтов первого поколения.

Действие отравленной приманки на грызунов определяют по трем основным параметрам:

- поедаемость (привлекательность) приманки;
- количество погибших;
- время гибели.

В качестве дополнительных параметров используют количество поглощенного грызуном ДВ в миллиграммах и количество ДВ в

пересчете на единицу массы тела (мг/кг). Вес грызуна и его изменение определяют в начале опыта и по его окончании.

Первичные результаты опытов фиксируют в «Рабочем журнале», а затем рассчитывают необходимые параметры. Примеры расчетов и их оформление представлены на рис.3.1, в табл. 3.1 и 3.2.

Поедаемость определяют по количеству корма, съеденного грызуном в течение одних суток. С этой целью ежедневно взвешивают остаток корма в кормушке и определяют разницу между первоначальным весом корма и весом остатка.

Рис.3.1. Рабочий журнал (образец)

№ п\п	Дата начала опыта	Вид	Пол	вес (г)	Продолжительность эксперимента (сутки)														
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	3.03.05.	Крыса серая	самец	грызуна (г)	265	-	-	-	-	-	245								
				остаток приманки в кормушке (г)	100	85	75	70	65	60	60								
				съедено приманки (г)	0	15	10	5	5	5	0								
				остаток альтернативного корма в кормушке (г)	100	90	85	80	75	75	75								
				съедено альтернативного корма (г)	0	10	5	5	5	0	0								
7	3.03.05.	Домовая мышь	самка	грызуна (г)	27	-	-	-	-	22									
				остаток приманки в кормушке (г)	50	43	37	32	29	29									
				съедено приманки (г)	0	7	6	5	3	0									
				остаток альтернативного корма в кормушке (г)	50	45	43	40	38	38									
				съедено альтернативного корма (г)	0	5	2	3	2	0									

Средний вес грызуна рассчитывают по формуле:

$V_{ср} = (V_x + v_x)/2,$

где:

$V_{ср}$ – средний вес грызуна;

x - порядковый номер грызуна;

V_x – вес грызуна вначале опыта;

v_x – вес грызуна в день гибели (Табл.3.1).

Таблица 3.1.

Динамика поедаемости исследуемой приманки и альтернативного корма серыми крысами

№ п\п x	пол	Вес крысы (г)			Количество съеденного корма по дням (г)											
		вначале опыта	в день гибели	Средний	1		2		3		4		5		6	
					О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К
		V_x	v_x	$V_{ср}$	P_x	p_x	P_x	p_x	P_x	p_x	P_x	p_x	P_x	p_x	P_x	p_x
1	самец	265	245	255	15	10	10	5	5	5	5	5	5	0	†	†
…	…	….	….	….	…	…	….	…	…	…	…	…	…	…	….	…
n	самка	200	196	198	15	15	15	5	10	5	5	0	†	†		
Среднее (m)		m_{Vx}	m_{vx}	$m_{Vcp} = \frac{\sum V_{cp}}{(1\ldots n)}{n}$												

Примечание: † – гибель крысы; О – опыт (исследуемая приманка); К – контроль (альтернативный корм); P_x – съедено корма в опыте(x = 1,2…n); p_x – съедено корма в контроле; n – количество крыс в эксперименте; остальные обозначения в тексте.

Среднее арифметическое (m) веса крыс в начале эксперимента (mV_x) и веса погибших крыс (mv_x) рассчитывают по следующим формулам:

$$m_{Vx} = \frac{\sum V_{1\ldots n}}{n} \pm \Delta \text{ или } m_{vx} = \frac{\sum v_{1\ldots n}}{n} \pm \Delta ,$$

где:

n – количество крыс в опыте (объем выборки);

$\sum V_{1\ldots n}$ – сумма веса крыс, в начале эксперимента ($V_1 + V_2 + \ldots + V_n$);

$\sum v_{1\ldots n}$ – сумма веса погибших крыс ($v_1 + v_2 + \ldots + v_n$);

Δ - средняя ошибка.

$$\Delta = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ где}$$

σ – среднее квадратичное отклонение.

Таблица 3.2.

Поедаемость приманки и количество ДВ в организме серых крыс

№ п\п	Съедено корма в течение эксперимента					Количество действующего вещества, поглощенного крысой		Время гибели крыс (сутки)
	в граммах.			в %		мг	мг / кг	
x	Опыт $\sum P_x$	Контроль $\sum p_x$	Итого P	Опыт G_x	Контроль R_x	DB_x	$Dв_x$	t_x
1	40	25	65	62	38	2,0	7,8	6
.	.	.	.	.	.	.	.	.
n	45	25	70	64	36	2,3	11,6	5
среднее								

Примечание: концентрация ДВ в приманке 0,005%; обозначения в тексте.

Определение относительной поедаемости исследуемой приманки G_x и альтернативного корма R_x для крысы в % (табл.3.2):

$$G_x = \frac{\sum P_x}{P} \cdot 100\% \quad , \quad R_x = \frac{\sum p_x}{P} \cdot 100\%$$

где:

G_x – поедаемость приманки (%);

R_x – поедаемость альтернативного корма (%);

$\sum P_x$ – количество приманки съеденной крысой в опыте (мг);

$\sum p_x$ – количество альтернативного корма съеденного крысой в опыте (мг);

P – общее количество корма (мг) съеденного крысой в опыте ($\sum Px + \sum px$);

Определение количества действующего вещества, поглощенного крысой в мг (табл.3.2):

$$DB_x = \sum P_x \cdot 10 \cdot C ,$$

где:

DB_x – количество действующего вещества, поглощенного крысой в мг;

С – концентрация действующего вещества в приманке (%);

Определение количества действующего вещества, поглощенного крысой в пересчете на килограмм веса (Табл.2):

$$Db_x = \frac{1000 \cdot DB_x}{Vcp} ,$$

где:

DB_x – количество действующего вещества, поглощенного крысой в мг/кг;

$V_{ср}$ – среднее значение веса крысы (Табл.3.1).

3.2.2. Методы исследований эффективности различных форм родентицидов

Исследование эффективности готовых форм родентицидов острого и кумулятивного действия.

Готовые формы родентицидов могут быть представлены на испытание в виде зерновой приманки, гранул, мягких и парафиновых брикетов, капсул, галет, таблеток, паст и т.д. с известным действующим веществом и его концентрацией.

Эффективность готовых форм родентицидов изучают на целевых видах грызунов: серых крысах, домовых мышах, серых полевках. В процессе эксперимента проводят сравнительный анализ

поедаемости отравленной приманки и альтернативного корма, определяют срок наступления гибели грызунов и их количество в процентах, от общего числа используемых в опыте грызунов (п. 3.1).

Продолжительность эксперимента по испытанию готовой формы с родентицидами различного типа действия дается в п. 3.1.

При низкой эффективности готовой родентицидной формы грызуны в течение указанных сроков не погибают.

Критериями оценки эффективности готовых форм служат следующие параметры:

– для родентицидов острого действия:

гибель в присутствии альтернативного корма мышей и крыс (%) – не менее 80;

время гибели (сутки) – не более 3;

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки в присутствии альтернативного корма мышами и крысами (% от суточного рациона) – не менее 10%;

– для антикоагулянтов I поколения:

гибель в присутствии альтернативного корма мышей и крыс (%) – не менее 80;

время гибели, (сутки) – не более 14;

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки в присутствии альтернативного корма (кроме приманок для мышей на основе этилфенацина, зоокумарина, куматетралила) мышами и крысами (% от суточного рациона) – не менее 15;

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки на основе этилфенацина, зоокумарина,

куматетралила в присутствии альтернативного корма мышами (% от суточного рациона) – не менее 20;

– для антикоагулянтов II поколения:

гибель в присутствии альтернативного корма мышей и крыс (%) – не менее 90;

время гибели (сутки) – не более 10

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки в присутствии альтернативного корма мышами и крысами (% от суточного рациона) – не менее 15;

– для готовых форм с витаминами D_2 и D_3:

гибель мышей (%) – не менее 80;

крыс (%) – «–»;

время гибели (сутки) – не более 7;

поедаемость готовой формы в присутствии альтернативного корма мышами (% от суточного рациона) – не менее 10;

крысами (% от суточного рациона) – «–».

Исследование эффективности субстанций (техническое ДВ) и концентратов ДВ.

Субстанции и концентраты ДВ изучают в виде стандартной отравленной приманки (п.3.1).

На основе субстанции сначала готовят концентрат с нужным содержанием ДВ в форме масляного или иного раствора, эмульсии, суспензии или порошка с красителем, достаточным для индикации равномерности распределения действующего вещества в приманке. В качестве красителя используют вещества, не влияющие на поедаемость приманки грызунами. Количество действующего вещества в концентрате рассчитывают по формуле:

$$ДВ = \frac{к \cdot ДВ_2}{ДВ_1},$$

где:

ДВ – количество действующего вещества (г);

к – количество концентрата (г);

$ДВ_1$ – содержание ДВ в субстанции (%);

$ДВ_2$ – заданное содержание ДВ в концентрате (%).

Для приготовления стандартной приманки, используемой в качестве модели, концентрат перемешивают с пищевой основой (овсяной крупой). Качество перемешивания контролируют по равномерности окрашивания приманки красителем.

Оценку эффективности субстанций и концентратов проводят на стандартной приманке, по методике и критериям, изложенным в п. 3.1.

Исследование эффективности липких родентицидных покрытий.

Эффективность липкого родентицидного покрытия при заданной концентрации ДВ изучают на грызунах целевых видов: серых крысах, домовых мышах, серых полевках. Оценивают сроки и процент гибели грызунов, их отношение к липкому родентицидному покрытию, в том числе наличие и характер реакции избегания (неофобия, репеллентность).

Липкие родентицидные покрытия изучают на грызунах, содержащихся поодиночке в вольерах, где оборудованы две одинаковых дорожки или туннеля для их передвижения от гнездового домика к кормушке. После адаптации грызуна к условиям содержания, на одну дорожку или туннель длиной 0,25 м

по всей длине наносят липкое родентицидное покрытие слоем в 1-2 мм. Другая дорожка или туннель остаются чистыми.

Отмечают количество проходов грызуна к корму по каждой дорожке за сутки. Наблюдения проводят визуально в период максимальной активности грызуна или при помощи автоматических датчиков, установленных перед кормушками. Время гибели зависит от количества проходов грызуна по ядовитому липкому покрытию.

Грызуну позволяют контактировать с липким родентицидным покрытием не более 10 суток. Если он в течение этого время не погиб, его отсаживают в клетку для определения времени гибели.

Покрытие считается эффективным, если не менее 80% подопытных животных погибает в течение 10 суток.

Если в течение первых двух дней животные используют только дорожки или туннель без покрытия, то имеет место реакция неофобии на покрытие. Если эта реакция сохраняется до конца экспозиции липкого родентицидного покрытия, то имеет место репеллентность.

Возможна оценка эффективности липких родентицидных покрытий при отсутствии альтернативного пути перемещения в условиях принудительного пропускания грызуна по туннелю, обработанному липким родентицидным покрытием, что позволяет определить количество проходов, необходимых для его гибели.

Критериями оценки эффективности липких родентицидных покрытий, служат следующие параметры:

гибель мышей и крыс (%) – не менее 80;

экспозиция (сутки) – не более 10.

3.3. Методы исследования эффективности репеллентов

Исследование эффективности отпугивающих химических соединений по поедаемости корма содержащего репеллент.

Эффективность репеллентов изучают на грызунах целевых видов: серых крысах, домовых мышах, серых полевках.

Исследуемый репеллент вводят в корм. При различных концентрациях репеллента в корме определяют наличие или отсутствие у химического вещества свойств, отпугивающих грызунов и степень его репеллентной активности. С этой целью одинаковое количество корма с репеллентом и без него предлагают грызунам содержащимся по одиночке. В качестве пищевой основы используют как в опыте, так и в контроле овсяную крупу (п. 3.1). В течение 3 дней учитывают поедаемость корма с репеллентом и без него.

На основании полученных результатов определяют коэффициент отпугивающего действия корма с репеллентом по формуле:

$$КОД = 100 - \frac{100 \cdot T_C}{(T_C + E)},$$

где:

КОД – коэффициент отпугивающего действия (%);

ТС – съедено корма с содержанием репеллента С (г);

Е – съедено корма без репеллента (г);

Эффективность репеллента оценивают по КОД.

КОД = 100~90 – сильно отпугивающие вещества;

КОД = 89~80 – вещества с удовлетворительными результатами отпугивания;

КОД = 79 и ниже – малоэффективные вещества.

Длительность репеллентной активности химического вещества определяют по КОД корма с добавкой репеллента.

Исследование эффективности отпугивающих химических соединений по выбору пути перемещения к пище.

Эксперимент проводят в клетке, разделенной на две половины перегородкой с двумя отверстиями. Грызун из гнездовой половины клетки стремится через то или иное отверстие проникнуть в половину, где находится корм и вода. В эксперименте одно из отверстий закрывают экраном из фильтровальной бумаги, обработанной раствором репеллента, другое – закрывают необработанным экраном из фильтровальной бумаги. Экран заменяют новым при каждом повреждении. Наблюдения за поведением грызуна проводят ежедневно по два часа в течение трех дней в светлое время суток. Отмечают количество повреждений экрана каждого отверстия и переходов грызуна в кормовую половину. Эффективность репеллента оценивают по «коэффициенту повреждения» (КП). Коэффициент определяют по отношению числа повреждений грызуном преграды, обработанной репеллентом ($П_р$) к числу повреждений грызуном преграды не обработанной репеллентом ($П_с$).

$$КП = \frac{П_р}{П_с}$$

Если КП меньше единицы, то испытываемое вещество обладает репеллентными свойствами. Наибольшей репеллентной активностью обладают химические соединения, «коэффициент повреждения» которых приближается или равен нулю. Испытываемое вещество не

обладает репеллентными свойствами, если КП равен или больше единицы.

Исследование эффективности ультразвуковых родентицидных средств по их влиянию на поедаемость корма.

Определение эффективности ультразвукового излучателя (УЗИ) проводят в специально оборудованном полигоне, размером 5х10 м, разделённом на опытную и контрольную половины металлическим барьером-экраном. В каждой половине выставляют равное количество домиков-укрытий и кормушек таким образом, чтобы одна половина полигона являлась зеркальным отражением другой. Корм в кормушках всегда должен быть в избытке.

В опытной половине помещают устройство УЗИ так, чтобы кормушки попадали под действие ультразвукового излучения. Затем в опытную и контрольную половины полигона запускают равные группы грызунов по 3-5 особей в каждой группе. В течение трех суток грызуны адаптируются к новым условиям. В регистрационном журнале ежедневно отмечают количество съеденного ими корма в каждой половине полигона. По окончании периода адаптации в опытной половине полигона включают устройство УЗИ. Устройство остается включенным 5 суток. В течение этого времени в опытной и контрольной половинах полигона определяют ежедневную поедаемость корма грызунами.

Результаты заносят в «Рабочий журнал», а затем рассчитывают коэффициент отпугивающего действия УЗИ. Примеры расчетов и их оформление представлены в табл. 3.3.

Эффективность действия УЗИ на грызунов оценивают по поедаемости корма. Сравнивают количество съеденного корма в

контрольной и опытной группах. Устройство УЗИ оценивают, как эффективное, если во время его действия поедаемость корма зверьками опытной группы составила не более 10% среднесуточного рациона, а разница в поедаемости корма с контрольной группой составляет не менее 40%.

Радиус действия УЗИ определяют опытным путем, устанавливая кормушки на различном расстоянии от источника излучения.

Таблица 3.3.

Поедаемость корма серыми крысами при воздействии на них УЗИ

Полигон размером 5х10м	Вид	Количество грызунов	№ кормушки		Количество съеденного корма (г)															
					в период адаптации (сутки)					в эксперименте (сутки)							Всего	в процентах	
			контроль (вне зоны УЗИ)	опыт (в зоне действия УЗИ)	1	2	3	всего	среднее	1	2	3	4	5	всего	среднее		опыт	контроль
Опытная половина	Крыса серая	5		1	28	25	15	68	23,7	4	1	2	2	5	14				
				2	25	23	30	78	26,0	3	1	1	6	4	15				
				3	20	20	27	67	22,3	2	3	1	3	6	15				
				4	12	16	13	41	13,7	1	1	1	9	7	19				
				5	30	21	20	71	23,7	2	1	2	6	5	16				
				6	27	20	17	64	21,3	1	2	1	9	8	21				
всего					142	125	122	389	129,7	13	9	8	35	35	100	20	149,7	13	87
среднее								64,8											
Контрольная половина	Крыса серая	5	1		19	23	24	66		24	30	22	25	29	130				
			2		21	22	21	64		23	26	31	29	23	132				
			3		19	21	23	63		26	24	23	33	23	129				
			4		17	20	22	59		20	27	27	30	21	125				
			5		20	25	21	66		27	21	21	31	20	120				
			6		16	24	23	63		22	22	20	24	14	102				
итого					112	135	134	381	127	142	180	144	172	130	738	147,6	274,6	54	46
среднее								63,5							123				

3.4. Методы исследований эффективности механических дератизационных средств

Исследование эффективности клейких масс и готовых клеевых ловушек.

Испытание проводят в вольерах при одиночном или групповом содержании грызунов. Определение эффективности клейких масс осуществляют с помощью клеевых пластин, выполненных из материала, не впитывающего клей. При контакте грызуна с клеевой поверхностью пластины, клеевая масса должна удерживать зверька. Для домовых мышей и полевок используют пластины размером 12х20 см. Для опытов с крысами применяют пластины размером 20х25 см. Клеевую массу на поверхность пластины наносят сплошным слоем не более 1 мм. Пластины с клеевой массой помещают перед кормушкой, либо в другом месте и тогда в центр клеевой поверхности приклеивают в качестве приманки небольшой кусочек хлеба с растительным маслом.

Показателем эффективности клейкой массы является удерживание не менее 80% зверьков весом не более 100 г.

Исследование эффективности живоловок.

Живоловки для крыс и мышей бывают целиком из металлической сетки, оцинкованного железа с отверстиями, из металлической сетки, закрепленной на деревянной доске или пластмассовые. Одноразовые устройства имеют дверцу, которая захлопывается при сдергивании грызуном приманки с крючка или надавливании на трапик. Балансирующая одноразовая живоловка состоит из пластмассовой трубки квадратного сечения, изогнутой под определенным углом, и дверцы, захлопывающейся при нарушении баланса. Грызун входит внутрь ловушки по

горизонтально расположенной части трубки и при переходе в другую её половину нарушает баланс ловушки, от чего дверца приподнимается и захлопывается.

Многоразовые живоловки (типа верш) изготовлены из металлической сетки. Грызуны попадают внутрь по сужающемуся проходу или через отверстие с трапиком. Трапик срабатывает под тяжестью грызуна, который попадает в вершу, а трапик под действием пружины принимает первоначальное положение и закрывает выход грызуну. Оценку эффективности живоловок проводят по методике, используемой для испытания одноразовых механических устройств с учетом специфики многоразового попадания.

3.5. Методы исследований эффективности химических родентицидных средств в условиях группового содержания грызунов

Эксперименты на семье или искусственно созданной группировке грызунов позволяют имитировать их поведенческие реакции по отношению к родентицидным средствам, характерные для естественных условий, и более точно оценить эффективность испытываемых средств.

Исследование эффективности готовых форм родентицидов острого и кумулятивного действия.

Реакция грызунов на родентицидные средства в условиях группового содержания в вольере приближенно отражает их поведение в естественных условиях. Отношения животных в группировке определяют иную степень контакта грызунов с родентицидными средствами, чем при одиночном содержании, связанную с их социальным поведением.

Эксперименты по оценке эффективности родентицидных средств на семейных или искусственно созданных группах грызунов осуществляют в вольерах, оборудованных одним или двумя домиками, поилкой и двумя кормушками, которые подвешивают на одной из боковых стенок вольеры или укрепляют симметрично на противоположных стенках. Группировку формируют из 5 грызунов (трех самцов и двух самок, причем увеличение количества самок возможно, а самцов – не рекомендуется) и выдерживают их совместно в течение 3-х дней - для установления иерархической структуры в группировке (минимально необходимое время), а также для определения количества корма, съедаемого за сутки. После образования в группировке устойчивых взаимоотношений, одну из кормушек заполняют отравленной приманкой, другую – альтернативным (контрольным) кормом. Вес его в кормушках должен превышать суточную норму, необходимую для питания группы, в 1,5 раза. По мере необходимости добавляют корм в кормушки. Для определения поедаемости ежедневно взвешивают остаток корма (п. 7.1.). Кормушки ежедневно меняют местами.

Критериями оценки эффективности готовых форм служат параметры, указанные в п.7.2.2.

Исследование эффективности липких родентицидных покрытий.

Эксперимент осуществляют в вольере, имеющей 1-2 гнездовых домика и поилку. Группировку грызунов формируют, как описано выше (стр. 13).

Липкое родентицидное покрытие наносят слоем 1-2 мм на пластину размером 25х25 см. В середину пластины прикрепляют небольшую кормушку (не более 6х6 см) с весом корма,

превышающим суточную норму питания грызунов. Пластину с кормушкой помещают в вольеру. Корм используют в качестве приманки, а поедаемость его как индикатор контакта грызунов с липким родентицидным покрытием. Ежедневно взвешивают остаток корма в кормушке и определяют поедаемость корма. Существует прямая зависимость между количеством контактов грызунов с липким родентицидным покрытием и количеством съеденного корма.

Время гибели грызунов зависит от количества контактов их с липким родентицидным покрытием. Эксперимент в вольере проводят не более 10 дней. Затем оставшихся в живых грызунов пересаживают по одному в клетки для определения сроков их гибели.

Для определения репеллентности липкого родентицидного покрытия в вольеры помещают две кормушки с одинаковым кормом. Одна кормушка закреплена на площадке, обработанной ядовитым покрытием, другая – на площадке без покрытия. По количеству съеденного корма в каждой кормушке определяют наличие у покрытия репеллентных свойств.

3.6. Методы оценки эффективности дератизационных средств в естественных местообитаниях грызунов (в натурных условиях)

3.6.1. Требования к проведению испытаний дератизационных средств в натурных условиях

Биологическую активность и целевую эффективность дератизационных средств изучают на объектах, заселённых грызунами. Для проведения экспериментов выбирают объекты с высокой или средней численностью грызунов.

Наличие и количество грызунов, а также их видовой состав, первоначально устанавливают на основании опроса работников объекта и визуального его обследования по следам жизнедеятельности грызунов. Уточнение видового состава грызунов и степени заселенности объекта проводят с помощью контрольно-пылевых (следовых) площадок или пищевых приманок без токсиканта, то есть методами, которые не изменяют состав и количество грызунов на объекте.

Изучение эффективности дератизационных средств на объекте осуществляют не более 10 суток для родентицидов острого действия, механических средств (ловушек, живоловок, клеевых устройств) и ультразвуковых излучателей (УЗИ), 28 суток для антикоагулянтов второго поколения и родентицидов смешанного действия (витаминов D_2 и D_3) и 40 суток для антикоагулянтов первого поколения.

Эффективность действия отравленной приманки на грызунов определяют по следующим основным параметрам:

- поедаемость приманки;
- время появления трупов;
- изменение относительной численности грызунов
- скорость освобождения объекта от грызунов.

На объекте отравленную приманку помещают в кормушки, в зависимости от численности грызунов, в количестве от 20 до 100 г. На объекте менее 100 $м^2$ расставляют не более пяти кормушек. Одновременно оборудуют не более 10 контрольно-пылевых (следовых) площадок.

На объектах более 100 $м^2$ кормушки расставляют в соответствии СанПин 3.5.3.1129-02, то есть 8 г приманки на 1 $м^2$.

При этом на одну кормушку должно приходиться 50 г отравленной приманки.

Дополнительными параметрами, с помощью которых оценивают эффективность дератизационных средств в естественных местах обитания грызунов, являются: снижение их численности и динамика видового состава, а для механических или клеевых дератизационных средств – их уловистость.

Поедаемость определяют по количеству корма, съеденного зверьками на объекте в течение одних или двух суток. С этой целью взвешивают остаток корма в кормушках и определяют разницу между первоначальным весом корма и весом остатка. Частота контрольных взвешиваний зависит от численности грызунов на объекте. При высокой численности взвешивание корма следует проводить один раз в сутки. Кормушками могут служить пластиковые одноразовые тарелки, ящички размером 10х10 см, специальные стандартные контейнеры для приманки.

Одновременно методом контрольно-пылевых (следовых) площадок определяют относительную численность грызунов на объекте. Контроль численности грызунов до и после эксперимента проводят по одной и той же методике с соблюдением стандартных требований к расстановке средств учета и сроков их экспозиции (то есть периоду между расстановкой и контролем средств учета).

Скорость освобождения объекта определяют по увеличению количества не заслеженных контрольно-пылевых (следовых) площадок по дням.

Первичные результаты опытов заносят в «Рабочий журнал» (рис. 7.2).

На объекте, выбранном для проведения испытаний, не должны проводиться другие дератизационные мероприятия, а также не должно быть других родентицидных средств.

В процессе испытаний дератизационных средств оценивают также безопасность и удобство их применения в естественных местах обитания грызунов и определяют соответствие правилам охраны труда и техники безопасности.

Рис. 3.2.

Рабочий журнал

№ п/площадки	№ кормушки	Дата начала опыта	Вид	Наименование контрольного учета	Время контрольного учета (сутки)									
					0	2	4	6	8	10	12	14	16	…
-	2	3.03.05.	-	остаток приманки в кормушке (г)										
				съедено приманки (г)										
3	-	3.03.05.	Крыса серая	Кол-во пылевых площадок										
				п/площадка со следами										
				п/ площадка без следов										
7	-	3.03.05.	Домовая мышь	Кол-во пылевых площадок										
				п/площадка со следами										
				п/ площадка без следов										

3.6.2. Методы исследований эффективности дератизационных средств

Методика контрольно-пылевых (следовых) площадок.

Данная методика позволяет обнаружить грызунов на объекте и оценить заселенность его грызунами, определить их видовую принадлежность и пути передвижения. При изучении дератизационных средств и оценки их эффективности, методику контрольно-пылевых (следовых) площадок применяют для определения тенденции изменения количества грызунов на объекте. Динамика заслеженных грызунами площадок в сторону уменьшения

происходит вследствие применения средства и отражает его эффективность.

Контрольно-пылевые (следовые) площадки размером 10х20 см покрытые слоем муки, талька или другого пылевидного материала размещают в местах вероятного передвижения грызунов по объекту и, прежде всего, в углах, вдоль стен, перегородок, вблизи дверей и окон. Количество площадок на объекте зависит от его площади.

На объектах или помещениях менее 100 м^2 оборудуют не более 10 площадок. При этом площадки располагают вдоль плинтусов по бокам дверного проема (две), в углах комнаты (четыре), под окном (одна) и по середине основания боковых стен (две). На объектах площадью более 100 м^2 контрольно-пылевые (следовые) площадки оборудуют из расчета: одна площадка на 5-10 м^2.

По следам, оставленным грызунами на контрольно-пылевых (следовых) площадках, вычисляют относительное их количество на объекте. Для этого определяют количество площадок со следами пребывания грызунов и рассчитывают процент заслеженных площадок по формуле:

$$К = \frac{А \times 100}{Б},$$

где:

К – число заслеженных площадок в %;

Б – всего площадок на объекте (штук);

А – количество заслеженных площадок (штук).

При обнаружении на площадках следов крыс, мышей или полевок, чтобы определить относительное их количество, рассчитывают % заслеженных площадок по каждому виду.

Исследование биологической активности и целевой эффективности дератизационных средств в естественных местах обитания.

Биологически активное средство должно вызывать гибель грызунов (отравленные приманки, липкие покрытия, механические и клеевые умерщвляющие устройства), либо ограничивать их передвижение (живоловки) или проникновение (репелленты и УЗИ) на объект. Чем быстрее исчезают грызуны в помещениях объекта, тем эффективнее испытываемое средство и тем меньшее количество площадок заслежено грызунами. Эффективность дератизационного средства оценивают по скорости освобождения объекта от грызунов. Для этого до начала эксперимента учитывают количество заслеженных и не заслеженных площадок и рассчитывают относительную численность грызунов. Затем на объекте размещают испытываемое дератизационное средство в соответствии с нормами, указанными в п. 7.1. После этого ежедневно проверяют контрольно-пылевые (следовые) площадки, учитывая количество заслеженных и незаслеженных площадок.

Поедаемость приманок определяют по количеству корма, съеденного грызунами на объекте в течение одних или двух суток. Процент съеденной приманки определяют от общего количества разложенного корма за каждые сутки или в среднем за выбранный период. Для определения количества поедаемого корма в кормушки раскладывают взвешенные его порции. В каждую кормушку раскладывают от 50 до 100 г приманки и расставляют как указанно в п. 7.1. Чтобы при осмотре не пропустить кормушки, их следует пронумеровать.

Через одни или двое суток корм в кормушках взвешивают. После этого весь оставшийся корм собирают, а в кормушки раскладывают другой из предварительно подготовленной и взвешенной новой порции. Вычитая из исходного веса корма последующий, определяют массу корма, съеденного грызунами за день в каждой кормушке. Корм раскладывают 2-3 раза и рассчитывают среднее потребление приманки за определенный период наблюдения.

Количество контрольно-пылевых (следовых) площадок рассчитывают исходя из норм указанных выше.

Эффективность давилок, живоловок, клейких масс или готовых клеевых ловушек, липких ядовитых покрытий, ультразвуковых родентицидных средств, отпугивающих химических соединений оценивают по скорости освобождения объекта от грызунов, используя для контроля метод контрольно-пылевых (следовых) площадок.

Эффективность дератизационного средства расчитывают по формуле:

$$Э = \frac{(К_1 - К_2) \times 100}{К_1},$$

где:

Э – эффективность дератизационного средства (%);

$К_1$ – число заслеженных площадок на объекте до начала эксперимента (%);

$К_2$ – число заслеженных площадок в конце эксперимента (%).

$К_1$ и $К_2$ определяют по формуле процента заслеженных площадок – К (п. 7.2)

3.6.3.Критерии оценки биологической активности и целевой эффективности дератизационных средств в естественных местах обитания

– для родентицидов острого действия:

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки мышами и крысами (% от общего количества приманки) – не менее 5;

появление трупов грызунов (сутки) – на 3;

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 10;

– для антикоагулянтов I поколения:

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки (кроме приманок для мышей на основе этилфенацина, зоокумарина, куматетралила) мышами и крысами (% от общего количества приманки) – не менее 15;

появление трупов грызунов (сутки) – на 10;

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 40;

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки на основе этилфенацина, зоокумарина, куматетралила мышами (% от общего количества приманки) – не менее 10;

появление трупов грызунов (сутки) – на 15;

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 40;

– для антикоагулянтов II поколения:

поедаемость готовой формы родентицидов или приготовленной стандартной отравленной приманки мышами и крысами (% от общего количества приманки) – не менее 10;

появление трупов грызунов (сутки) – на 10;

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 28;

– для готовых форм с витаминами D_2 и D_3:

поедаемость готовой формы мышами (% от общего количества приманки) – не менее 10;

крысами (% от общего количества приманки) – «-»;

появление трупов мышей (сутки) – на 5;

снижение кол-ва заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 28;

– для липких родентицидных покрытий:

появление трупов грызунов (сутки) – на 15;

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 40;

– для давилок, живоловок, клейких масс и готовых клеевых ловушек:

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 10;

– для ультразвуковых отпугивающих излучателей:

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 1-2 дней работы излучателя;

– для химических отпугивающих средств:

снижение количества заслеженных площадок или относительной численности грызунов на 98% (сутки) – в течение 1-2 суток продолжительностью не менее 5.