

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
ФИЛИАЛ «НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР САНИТАРНО-
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И МОНИТОРИНГА» РГП на
ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОБЩЕСТВЕННОГО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
РГП НА ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ОСОБО ОПАСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ ИМЕНИ МАСГУТА АЙКИМБАЕВА»

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ ПРЕДРЕГИСТРАЦИОННЫХ
ИСПЫТАНИЙ
СРЕДСТВ ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРЕДСТЕРИЛИЗАЦИОННОЙ ОЧИСТКИ,
СТЕРИЛИЗАЦИИ И АНТИСЕПТИКОВ**

(Методические указания)

Астана, 2023 г.

УДК 614.4(083.13)

ББК 51.90я73

М54

Рецензенты:

1. Алимханова К.Н. – к.м.н., доцент кафедры «Эпидемиология с курсом ВИЧ инфекции» Казахского Национального медицинского университета имени С.Д. Асфендиярова.

2. Тастанбаев С.О.- к.м.н., руководитель управления санитарно-гигиенического мониторинга филиала «НПЦСЭЭМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ» МЗ РК.

Авторы:

Абдишов С.К. - руководитель управления оказания государственных услуг Комитета санитарно-эпидемиологического контроля МЗ РК.

Куатбаева А.М. - директор филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Утегенова Э.С. – заместитель директора филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Тулешова Г. А. – главный специалист отдела дезинфектологии и организации инфекционного контроля управления профилактики инфекций и паразитарных заболеваний филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Аббасова Д.К. –заведующая референс лаборатории по контролю за бактериальными инфекциями и антибиотикорезистентностью филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Молдаязова Л.Т. - заведующая референс лаборатории по контролю химических веществ и остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Тлеумбетова Н.Ж. - заведующая референс лаборатории по контролю за особо опасными инфекциями филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Кусайнова Н.Ж. - заведующая референс токсикологии полимеров и других химических веществ филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Муталиева А.С. - заведующая референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ РК.

Жумадилова З.Б. – к.м.н., генеральный директор РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева» (далее ННЦООИ)

Рябушко Е.А. – к.б.н., начальник отдела биолог-технологического контроля, испытательной лаборатории ННЦООИ,

Мека–Меченко В.Г. – к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела эпизоотологии особо опасных инфекций с музеем и инсектарием ННЦООИ, Исламов Р.А. – к.б.н., заведующий лабораторией доклинических исследований с вивариумом ННЦООИ.

Методические указания по проведению лабораторных предрегистрационных испытаний средств дезинфекции, предстерилизационной очистки, стерилизации и антисептиков: Методические указания/ Абдишов С.К., Куатбаева А.М., Утегенова Э.С., Тулеушова Г. А., Аббасова Д.К., Молдаязова Л.Т., Тлеумбетова Н.Ж., Кусайнова Н.Ж., Муталиева А.С., Жумадилова З.Б., Рябушко Е.А., Мека –Меченко В.Г., Исламов Р.А.// Астана: Комитет санитарно-эпидемиологического контроля Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 2023. - 99с.

ISBN 978-601-305-525-1

Настоящие Методические указания устанавливает единые методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности при проведении дезинфектологической экспертизы.

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП на ПХВ «Национальный научный центр развития здравоохранения имени Салидат Каирбековой» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол заседания Департамента развития науки и образования РГП на ПХВ ННЦРЗ им. Салидат Каирбековой) № 422 от «27» декабря 2023 года

© Абдишов С.К., Куатбаева А.М., Утегенова Э.С., Тулеушова Г. А., Аббасова Д.К., Молдаязова Л.Т., Тлеумбетова Н.Ж., Кусайнова Н.Ж., Муталиева А.С., Жумадилова З.Б., Рябушко Е.А., Мека –Меченко В.Г., Исламов Р.А., 2023г.

Содержание.

1	Перечень сокращений, условных обозначений, символов.	6
2	Термины и определения.	7
3	Глава 1. Общие положения.	13
4	Глава 2. Требования к лабораториям, проводящим лабораторные испытания дезинфекционных средств, тест-штаммам, питательным средам испытаниям.	14
5	Глава 3. Методы определения эффективности дезинфицирующих средств.	25
6	Глава 4. Методы изучения и оценки вирулицидной активности дезинфицирующих средств.	46
7	Глава 5. Методы определения токсикологических показателей безопасности дезинфицирующих, стерилизующих средств.	50
8	5.1 Общие требования к организации и проведению токсикологических исследований дезинфекционных средств.	50
9	5.2 Методы изучения токсичности и опасности микробоцидных (дезинфицирующих) средств.	52
10	5.3 Перечень необходимых показателей токсичности и опасности дезинфицирующих средств.	53
11	5.4. Методы определения и оценки токсичности и опасности дезинфицирующих средств.	54
12	5.5. Оценка безопасности остаточных количеств дезинфицирующих средств на изделиях медицинского назначения.	64
13	5.6. Методы изучения токсичности и опасности кожных антисептиков.	67
14	5.7 Перечень необходимых токсикологических показателей при оценке токсичности и опасности дезинфицирующих средств.	69
15	Глава 6. Химико-аналитическая оценка состава и физико-химических свойств дезинфекционных средств.	69
16	Глава 7. Методы определения целевой эффективности средств дезинсекции.	71
17	Глава 8. Методы определения целевой эффективности средств дератизации.	85

18	Глава 9. Оценка токсичности и опасности средств дезинсекции и дератизации.	88
19	Глава 10. Заключительные положения.	97
20	Список использованных источников.	99

1. Перечень сокращений, условных обозначений, символов.

ДС	дезинфекционные средства
ДВ	действующее вещество
LD ₅₀	доза средняя смертельная
LC ₅₀	концентрация средняя смертельная
ПДК	предельно-допустимая концентрация
TL ₅₀	время средней гибели
C ₂₀	степень летучести
КОЕ	колониеобразующие единицы
ТЦД	титр цитотоксического действия
МПА	мясо-пептонный агар
МПБ	мясо-пептонный бульон
КСА	казеин-соево-пептонный агар
КСР	казеин-соево-пептонный раствор
ДРД	длительность репеллентного действия
КОД	коэффициент отпугивающего действия
АЮГ	аналоги ювенильного гормона
МЗ РК	Министерство здравоохранения Республики Казахстан
ЦПЭ	цитопатический эффект
ВЛК	внутрилабораторный контроль
ТЦИД ₅₀	тканевая инфекционная цитопатогенная доза 50%
ИМН	изделия медицинского назначения
мл	миллилитр
мг	миллиграмм
РГП на ПХВ	республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
ННЦООИ	Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева
ЦПЭ	цитопатический эффект
СТИ	референтный штамм сибиреязвенного микроба
ДВУ	дезинфекция высокого уровня

2. Термины и определения.

- 1) Адаптация – процесс приспособления лабораторных животных к новым условиям окружающей среды.
- 2) Акарициды – средства (препараты), вызывающие гибель клещей.
- 3) Акарорепеллентные свойства – способность средства (препарата) отпугивать клещей.
- 4) Аналоги ювенильного гормона (АЮГ) – препараты на основе ювенильных гормонов насекомых, препятствующих их нормальному метаморфозу и используемые в качестве целевых инсектицидов.
- 5) Антидоты (противоядия) – химические соединения, способные обезвреживать попавшие в организм яды.
- 6) Антикоагулянты – химические соединения (чаще всего производные оксикумарина или индандиона), понижающие свертываемость крови позвоночных, вследствие чего при малейших повреждениях любых органов животные погибают от наружных и внутренних кровотечений.
- 7) Аттрактанты – вещества, привлекающие животных (преимущественно пищевые продукты или половые феромоны – сексаттрактанты).
- 8) Биологический метод борьбы – использование для регуляции численности животных их естественных врагов и паразитов.
- 9) Безопасность дезинфекционного средства – отсутствие вреда для здоровья человека, животных, окружающей среды при целевом применении дезинфекционного средства и соблюдении рекомендованных мер безопасности
- 10) Время средней гибели (TL_{50}) – количество суток, необходимое для гибели 50% животных в опыте.
- 11) Вторичные отравления – гибель нецелевых животных при поедании погибших от воздействия пестицидов (ядов) особей целевых видов.
- 12) Готовый продукт - это средство, содержащее определенную концентрацию действующего вещества или их композиция со вспомогательными компонентами.
- 13) Генетический метод борьбы – использование для регуляции численности животных разных способов их стерилизации.
- 14) Дезинфектологическая экспертиза процедура рассмотрения и оценки материалов, характеризующих дезинфекционное средство (включая результаты лабораторных, инструментальных, биологических, натуральных исследований и испытаний химического состава, безопасности, эффективности, а также сопровождающей дезинфекционное средство нормативной, методической и инструктивной документации), осуществляемая с целью защиты жизни или здоровья человека, предупреждения действий, вводящих в заблуждение потребителей. Результатом дезинфектологической экспертизы является экспертное заключение
- 15) Дезинфекционные средства (пестициды) – средства, предназначенные для проведения дезинфекции (дезинфицирующие средства), предстерилизационной очистки, стерилизации (стерилизующие средства), дезинсекции (инсектицидные, педикулицидные, акарицидные средства), дератизации (дератизационные средства), а также репеллентные средства.

16) Дезинсекционное средство (инсектициды) – средство (химическое, биологическое), предназначенное для проведения истребительных мероприятий в отношении членистоногих в целях снижения их численности.

17) Дератизационное средство – средство, применяемое для снижения численности грызунов до приемлемого уровня или для их уничтожения.

18) Дезинфицирующее средство (дезсредство) – средство, применяемое для уничтожения микроорганизмов в объектах (на объектах) окружающей среды.

19) Дезинфекция – комплекс мер по уничтожению возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний.

20) Дезинфекция высокого уровня – дезинфекция, при которой уничтожаются все патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, а количество спор снижается.

21) Дезинфекция среднего уровня – дезинфекция, при которой происходит уничтожение бактерий, вирусов (в том числе полиовирусов), грибов, микобактерий туберкулеза, но не происходит уничтожение спор.

22) Дезинфекция низкого уровня – дезинфекция, при которой происходит уничтожение бактерий, некоторых грибов, вирусов, но не эффективна в отношении таких устойчивых бактерий, как микобактерий туберкулеза.

23) Деградация пестицидов – разложение их в объектах окружающей среды с образованием простейших химических соединений, не представляющих опасности для человека и других живых организмов.

24) Дезинсекция – комплекс профилактических и истребительных мероприятий по уничтожению насекомых и членистоногих в целях защиты от них человека, животных, помещений и территории.

25) Действующее вещество (ДВ) – химическое вещество, входящее в состав дезинфекционного средства и обеспечивающее его эффективность.

26) Деларвация – уничтожение личинок и куколок вредных насекомых.

27) Дератизация – комплекс профилактических и истребительных мероприятий, направленных на уничтожение или снижение числа грызунов.

28) Длительность репеллентного действия (ДРД) – время (в часах), в течение которого происходит отпугивание от обработанной репеллентом поверхности тела количества насекомых, соответствующего избранному КОД.

29) Доза средняя смертельная (LD_{50}) – доза ядовитого вещества, вызывающая гибель 50% зверьков в опыте.

30) Защитная зона – территория вокруг населенного пункта, на которой уничтожены переносчики и/или носители инфекции.

31) Зооциды (родентициды, ратициды) – средства против грызунов.

32) Исследуемый материал – дезинфицирующее средство, подвергающееся предрегистрационному испытанию.

33) Исходные данные – информация, содержащаяся в первичной документации, описывающая результаты наблюдений и другой деятельности, позволяющая воссоздать картину предрегистрационного испытания и оценить его.

34) Имаго – взрослая, половозрелая особь у насекомых и других членистоногих.

35) Инсектоакарицидные свойства – способность средства (препарата) вызывать гибель не только насекомых, но и клещей, а также других членистоногих.

36) Концентрация средняя смертельная (LC_{50}) – концентрация вещества в воздухе, вызывающая гибель 50% животных в опыте при ингаляционном воздействии.

37) Коэффициент отпугивающего действия (КОД) – отношение числа кровососов, питавшихся на обработанной репеллентом поверхности тела к числу, напившихся за то же время на необработанной поверхности (в %).

38) Контрольный образец – часть исследуемого материала, хранящаяся в исследовательской лаборатории и предназначенная, в случае возникновения необходимости, для его идентификации или проведения дополнительных исследований.

39) Кумулятивные свойства – способность ядов накапливаться в живых организмах и вызывать их гибель при достижении определенного порога (летальной дозы).

40) Кумулятивные свойства – способность ядов накапливаться в живых организмах и вызывать их гибель при достижении определенного порога (летальной дозы).

41) Лабораторные испытания целевой эффективности – оценка заявленных производителем свойств ДС, инсектицидного (репеллентного) средства в условиях лаборатории, то есть в искусственных условиях, с применением специальных методических приемов.

42) Ларвицидное действие – способность инсектицида убивать не только имаго насекомых, но и их личинок, а также куколок.

43) Метаморфоз – цикл индивидуального развития насекомых и других членистоногих от яйца через несколько личиночных стадий и стадию куколки до взрослой особи (имаго).

44) Натурные (полупроизводственные) испытания – оценка заявленных производителем свойств ДС, инсектицидного (репеллентного) средства в естественных или приближенных к естественным условиям, то есть непосредственно в режиме, рекомендованном инструкцией по применению.

45) Оборонительная реакция – изменения в поведении животных целевых видов, позволяющие им уклоняться от воздействия средств, в том числе отказ от употребления в пищу приманок с ядами.

46) Овоцидное действие – способность инсектицида убивать не только имаго насекомых, но и их яйца.

47) Опасность средств – вероятность попадания в организм смертельной дозы.

48) Отчет о предрегистрационном испытании – документ, содержащий результаты предрегистрационного испытания и их анализ в соответствии с требованиями настоящих Методических указаний.

49) Предельно допустимая концентрация (ПДК) – максимальное, разрешенное санитарно-гигиеническими нормативами, количество вещества на единицу объема в воздухе или воде.

50) Полевая дезинсекция – уничтожение кровососущих членистоногих (преимущественно переносчиков инфекционных болезней) в открытых местообитаниях за пределами населенных пунктов, в том числе на пастбищах и в норах грызунов.

51) Полевая дератизация – уничтожение грызунов за пределами населенных пунктов.

52) Половые феромоны (сексаттрактанты) – вещества, выделяемые животными для привлечения особей противоположного пола и их полового возбуждения.

53) Поселковая дезинсекция – истребление вредных бытовых насекомых, эктопаразитов и других кровососов в пределах населенного пункта (как в помещениях, так и в открытых местообитаниях).

54) Поселковая дератизация – истребление грызунов в жилых помещениях, надворных постройках, животноводческих, производственных, складских и прочих зданиях и сооружениях, а также на открытой территории в пределах населенного пункта.

55) Препаративная форма – готовое к применению по целевому назначению дезинфекционное средство, состоящее из действующего вещества или смеси действующих веществ и функциональных компонентов.

56) Привыкание – повышение резистентности к воздействию пестицидов (ядов) при их неоднократном применении.

57) Приманочный метод борьбы – уничтожение животных с помощью привлекающих их веществ (пищевая основа, аттрактанты, феромоны), вместе с которыми подаются яды.

58) Первичная документация – исходные документы, данные и записи, используемые в ходе предрегистрационного испытания.

59) Протокол исследований (испытаний) – документ, содержащий необходимые сведения об исследованиях (испытаниях) подконтрольного товара, применяемых методиках, средствах и условиях исследований (испытаний), их результатах.

60) Повышенная чувствительность – аллергическая или другая нежелательная иммунологическая реакция на введение дезинфицирующего средства.

61) Регистрант – юридическое или физическое лицо, являющееся производителем представленного к государственной регистрации средства или уполномоченное в той или иной форме производителем на совершение правовых действий, связанных с государственной регистрацией.

62) Резистентность – устойчивость к воздействию пестицидов (ядов); она может быть естественной и приобретенной в результате неоднократного контакта с одним и тем же препаратом (возникает, в первую очередь у быстроразмножающихся видов).

63) Репелленты – средства (препараты), отпугивающие насекомых и других членистоногих.

64) Ротация дезсредств – замена используемых препаратов другими средствами во избежание привыкания животных целевых видов.

65) Репродуктивная токсичность – токсическое действие исследуемого материала на органы воспроизводства.

66) Синергисты – вещества, усиливающие действие пестицидов.

67) Скабициды – инсектицидные средства, предназначенные для обработки поверхностей в помещениях, одежды, белья и т. д. с целью уничтожения чесоточных клещей.

68) Спецификация на исследуемый материал – документ, устанавливающий требования к исследуемому материалу.

69) Средство для дезинфекции кожных покровов (кожный антисептик) – дезинфицирующее средство, обладающее антимикробным действием и предназначенное для обработки неповрежденных кожных покровов, за исключением средств, зарегистрированных (подлежащих регистрации) в качестве лекарственных средств и (или) медицинских изделий.

70) Средство предстерилизационной очистки – средство, предназначенное для удаления с медицинских изделий белковых, жировых и других загрязнений, препятствующих стерилизации или снижающих его эффективность;

71) Стерилизация – полное уничтожение всех видов возбудителей, в том числе спор, путем воздействия на них физическим, химическим, термическим или смешанными способами.

72) Стерилизующее средство – средство, предназначенное для уничтожения микроорганизмов всех видов (в том числе бактерий, вирусов, грибов) на всех стадиях их развития

73) Степень летучести (C_{20}) – насыщающая концентрация вещества в воздухе при 20°C и нормальном давлении.

74) Токсикологические исследования – определение уровня токсичности дезсредств с целью оценки их опасности для людей и возможного воздействия на окружающую среду.

75) Токсичность – способность веществ любой природы вызывать нарушения жизнедеятельности организма или его гибель.

76) Токсичность веществ – показатель, вычисляемый как величина, обратная средней смертельной дозе LD_{50} или средней смертельной концентрации токсичного вещества.

77) Токсичность подострая – мера вредного воздействия на организм подопытного животного при многократном (до 6 месяцев) введении исследуемого материала в рабочих разведениях дезинфектанта.

78) Токсичность хроническая – мера вредного воздействия на организм подопытного животного при многократном (до 12 месяцев) введении исследуемого материала в рабочих разведениях дезинфектанта.

79) Тест-системы – животные, растения, органы, клетки, вещества или действующее аналитическое оборудование, используемые для проведения предрегистрационных испытаний дезинфицирующих средств.

80) Физический метод борьбы – использование механических устройств, липких масс и других способов уничтожения грызунов или членистоногих без применения пестицидов (ядов).

81) Форма применения средств – способ конкретного использования препаратов в рекомендованных целях, определяемый, прежде всего, формой их выпуска и назначением.

82) Фумиганты – испаряющиеся при обычной температуре пестициды, действие которых на живые организмы может проявляться на расстоянии.

83) Хемостерилилянты (хемостерилизаторы) – препараты, применяемые для стерилизации самцов или самок насекомых с целью сокращения численности природной популяции вредных видов; могут использоваться как для стерилизации самцов в лабораториях с последующим выпуском их в природу, так и путем обработки природных популяций насекомых.

84) Химический метод борьбы – уничтожение тех или иных животных с использованием пестицидов (ядов).

85) Целевые виды – виды животных, против которых непосредственно предназначено то или иное средство.

86) Экологический метод борьбы – искусственное изменение соотношения ландшафтообразующих факторов и других условий обитания, приводящее к невозможности дальнейшего существования вида;

87) Эффективность дезинфекционного средства – абсолютный или относительный показатель, характеризующий достигнутый уровень стерилизации, дезинфекции, дезинсекции, дератизации.

Глава 1. Общие положения.

1. Настоящие Методические указания по проведению лабораторных предрегистрационных испытаний средств дезинфекции, предстерилизационной очистки, стерилизации и антисептиков (далее – Методические указания) устанавливают единые методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств эффективности и безопасности при применении в быту, в медицинских организациях и на других объектах для обеспечения безопасности жизни и здоровья людей. и согласованы с требованиями приложения «Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», утверждены решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года №299 (далее Решение КТС №299).

2. Требования данного нормативного документа являются обязательными для всех организаций и учреждений, которым уполномоченным органом в области здравоохранения предоставлено право проведения контроля качества и безопасности при испытаниях (предрегистрационные, сертификационные, производственные, контрольные испытания) дезинфекционных средств всех видов, независимо от их организационно-правовых форм и форм собственности.

3. Антимикробная эффективность дезинфицирующих средств определяется двумя количественными методами: тестами "in vitro" и тестами в условиях, приближенных к практической работе. Используемые методы испытаний эффективности и методы определения токсикологических показателей безопасности дезинфекционных средств различаются и зависят от назначения дезинфектанта и его препаративной формы. Применяемые методы испытаний должны быть включены в Единый перечень методов (методик), применяемых для оценки соответствия продукции Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) утвержденных решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года №299, Раздел 20.

4. Приведенные в данном нормативном документе методы исследований ДС являются обязательными при проведении предрегистрационных испытаний ДС. В случае необходимости, связанной с наличием (обнаружением) у исследуемого ДС тех или иных свойств, которые не могут быть оценены приведенными в едином перечне методов, допустимо применение дополнительных методов для всесторонней и адекватной оценки соответствующего дезинфекционного средства.

Глава 2. Требования к лабораториям, проводящим лабораторные испытания дезинфекционных средств, тест-штаммам, питательным средам и испытаниям.

5. Предрегистрационные испытания средств дезинфекции проводятся лабораториями (центрами), аккредитованными в национальных системах аккредитации (аттестации) и внесенными в Единый Реестр органов по сертификации и испытательных лабораторий (центров) Евразийского экономического союза на продукцию.

6. Учреждения, проводящие предрегистрационные испытания дезинфекционных средств, помимо наличия подготовленного персонала с соответствующим высшим и средним специальным образованием, должны иметь в своей структуре:

- 1) Изолированную от других помещений лабораторию, условия работы в которой соответствуют требованиям действующих нормативных правовых актов РК.
- 2) Экспериментально-биологическую клинику (далее - виварий) для манипуляций и содержания лабораторных животных, обеспечивающая условия и содержание, соответствующее требованиям действующих нормативных правовых актов.
- 3) Инсектарий, позволяющий содержать насекомых и других членистоногих, используемых в ходе лабораторных испытаний.

7. Работа в лаборатории должна проводиться в соответствии с системой обеспечения качества, что предусматривает контроль качества питательных сред и реактивов, исправность измерительных приборов, наличие сертификатов об их метрологическом контроле в установленные сроки, технические паспорта и рабочие инструкции по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности.

8. В лаборатории должны быть изолированные помещения для содержания экспериментальных и контрольных животных, а также для хранения ядохимикатов и работы с ними. При этом полностью должна быть исключена возможность миграции ядов в другие помещения.

9. Боксированные помещения и комнаты для работы с ядохимикатами должны иметь автономную систему приточно-вытяжной вентиляции, изолированную от других вентиляционных систем здания.

10. Для защиты рабочих помещений от попадания прямого солнечного света используются светозащитные пленки, жалюзи из материалов, устойчивых к химическим веществам и влажной обработке.

11. Уборку помещений лаборатории проводят ежедневно по окончании работы влажным способом. Перед началом уборки из помещения удаляют основные и вспомогательные материалы. Приточную и вытяжную вентиляции во время влажной ежедневной уборки не включают.

12. Круг лиц, допущенных к проведению предрегистрационных испытаний дезинфекционных средств, определяется первым руководителем и оформляется приказом по учреждению.

13. Лица, проводящие предрегистрационные испытания дезинфекционных средств, несут полную ответственность за документальное оформление проводимых работ, методическую их правильность и точность полученных результатов.

14. Для обеспечения безопасности персонала лаборатории, проводящего испытания ядовитых веществ, используется защитная одежда и другие средства индивидуальной защиты, комплектность которых определяется характером выполняемой работы в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов.

15. Для переодевания персонала, хранения чистой и защитной одежды должны быть предусмотрены отдельные вспомогательные помещения.

16. При поступлении на работу и в дальнейшем, не реже одного раза в год проводится инструктаж по технике безопасности всех работников, участвующих в проведении предрегистрационных испытаний.

17. Утилизация отходов, подстилочного материала, трупов животных, остатков кормов осуществляется в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов РК.

18. Планово-предупредительный ремонт лабораторного оборудования и инженерных систем обеспечения биологической безопасности подразделений должны осуществляться в соответствии с утвержденным графиком таких работ.

19. Протоколы лабораторных испытаний должны содержать результаты всех тестов в табличной форме. Количество микроорганизмов в используемой испытательной суспензии следует указывать в колониеобразующих единицах на 1 миллилитр. Кратность постановки экспериментов должна быть не менее трех (при условии получения однотипных результатов), при необходимости статистической обработки не менее восьми. Все опыты должны сопровождаться контролями: полноты нейтрализации дезинфектанта, жизнеспособности культуры тест-штамма, контроля контаминации тест-объекта.

Протокол должен содержать следующие сведения:

1) дата поступления дезинфекционного средства, дата начала и окончания исследований;

2) номер партии, серии, дата изготовления и дата истечения срока годности;

3) способ проверки и цель проведения испытания;

4) используемые тест-штаммы, питательные среды, лабораторные животные, нейтрализующее средство;

5) проверяемая (потребительская) концентрация (концентрации);

6) продолжительность воздействия;

7) количество предоставленного образца, форма выпуска;

8) температура при проверке;

9) температура проведения инкубации;

10) все важные математические и логарифмические значения или полученные коэффициенты редукации для соответствующих методов, уточненные до второго знака после запятой;

11) итоговое заключение;

12) Фамилии, имена и отчества лиц, проводивших испытания;

13) используемые тест-штаммы (с указанием номера штамма), питательные среды, вид лабораторных животных, нейтрализующее средство.

Тест-штаммы должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические, тинкториальные и ферментативные свойства, присущие данному штамму и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС и температуре.

Тест-микрорганизмы могут быть приобретены в любом состоянии в сопровождении документов, удостоверяющих свойства штамма лифилизированном состоянии в ампулах, KWIK-STIC, лиофилизированные гранулы-либо в виде посевов на скошенном агаре.

Номера референтных штаммов используемых в качестве тест-микрорганизмов могут меняться в связи с внедрением международных стандартов.

20. Тест-штаммы микрорганизмов, используемые при испытаниях эффективности дезинфицирующих средств:

- 1) *Escherichia coli* ATCC 8739, ATCC 25922, К-12.
- 2) *Staphylococcus aureus* 209P, ATCC 29213, ATCC 6538.
- 3) *Proteus mirabilis* ATCC 12453, ATCC 35659.
- 4) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, ATCC 27853, ATCC 9027.
- 5) *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, ATCC 14028.
- 6) *Yersinia pestis* EV.
- 7) *Yersinia pseudotuberculosis* № 2841.
- 8) *Listeria monocytogenes*.
- 9) *Pasteurella haemolytica* №7.
- 10) *Pasteurella multacida* №62.
- 11) *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium* B5.
- 12) *Mycobacterium tuberculosis* H37RV.
- 13) *Mycobacterium avium*.
- 14) *Bacillus anthracis* – вакцинный штамм Ценковского.
- 15) *Bacillus anthracis* (СТИ) – референтный штамм.
- 16) *Bacillus cereus* ATCC 10876, ATCC 11778, ATCC 13061, ATCC 61.
- 17) *Bacillus subtilis* subsp, *spizizenii* ATCC 6633.
- 18) *Francisella tularensis* КА 29, *Francisella tularensis* 240.
- 19) *Vibrio cholerae* O1 75M.
- 20) *Brucella abortus* № 544.
- 21) *Brucella melitensis* 16-M.
- 22) *Legionella pneumophila* subsp.
- 23) *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404.
- 24) *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305.
- 25) *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404, ATCC 9642).
- 26) *Candida albicans* ATCC 10231, ATCC 14053.
- 27) *Trichofiton mentagrophytes* (ATCC 9533).

28) для оценки вирулицидной активности в качестве тест-вирусов используют: вирус полиомиелита 1 типа - высокорезистентный вирус (для средств, рекомендуемых в борьбе и профилактике парентеральных и энтеральных вирусных гепатитов, полиомиелита, инфекций, вызываемых вирусами ЕСНО и Коксаки, ротавирусных гастроэнтеритов и др.); аденовирус 5 типа (штамм Аденоид 75). 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. Исходный вирус - это вирус, полученный из Референс-центров (из национальных или международных коллекций вирусов), размноженный в объемах, достаточных для длительной работы при минимальных количествах пассажиров. Храниться в малых объемах при необходимой для поддержания их жизнедеятельности температуре.

29) для методов, протекающих при температурах выше 60°C, следует использовать *Enterococcus faecium*.

21. Тест-штаммы должны иметь типичные морфологические, тинкториальные, культуральные свойства, присущие данному виду, кроме того тест-штаммы должны иметь следующую устойчивость к дезинфицирующим агентам (Таблица 1,2):

Таблица 1. Устойчивость к дезинфицирующим агентам

Дезинфицирующий агент	Разведение	Температура, °	Тест -штамм			
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
Хлорамин	1:1000	20	10 минут	-	-	-
	1:500	20	-	20 минут	-	-
	1:100	20	-	-	-	40 минут
	1:20	20	-	-	-	-
	1:10	20	-	-	6 часов	-
Фенол	1:100	20	-	-	-	40 минут
	1:90	20	20 минут	-	-	-
	1:70	20	-	25 минут	-	-
	1:50	20	-	-	-	-
Температура		60	20 минут	30 минут	-	-
		80	-	-	-	15 минут
Текущий пар		100	-	-	7 минут	-

Таблица 2. Устойчивость *Mycobacterium terrae* к эталонным ДС.

ДС	Концентрация раствора, %	Время гибели <i>Mycobacterium terrae</i> , минут
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

22. Тест-штаммы культивируют на следующих питательных средах: *E. coli* и *S. aureus* – на казеиновом агаре и бульоне, мясопептонном агаре и бульоне, агаре и бульоне Хоттингера; *C. albicans*, *T. gypseum* – на бульоне Сабуро, агаре Сабуро. Вирусы культивируют по общепринятым методикам на чувствительных биологических объектах (перевиваемая клеточная культура RD, НЕР-2 и L-20В). Титр вируса должен быть не менее 10^{6-5} ТЦД₅₀ в 1 мл. *V. cereus* – мясопептонном агаре и бульоне, агаре и бульоне Хоттингера.

M. terrae требовательны к питательным средам, растут на селективных средах (реакция среды почти нейтральная (рН 6,4-7,0): Левенштейна-Йенсена, «Новая», Миддлбука 7Н9 с 10% ростовой добавки АДС, 7Н10 с 10% ростовой добавки ОАДС и другие, *Mycobacterium tuberculosis humanus* H37RV растут на среды Левенштейна- Йенсена, Гельберга. *V. cereus*, *V. subtilis*, *V. anthracis* – пшеничном, мясо-пептонном агаре и бульоне, агаре и бульоне Хоттингера; *Francisella tularensis* – характер роста на питательных средах (FT-агаре или свернутой желточной среде Мак-Коя); *V. cholerae* non O1 КА-37; *Vibrio cholerae* O1 75М - на щелочном агаре, 1% пептонной воде. *V. aborus*, *V. melitensis* – печеночном, Бруцелла агаре и Бруцелла бульоне, эритрит агаре. *Legionella pneumophila* subsp. *Pneumophila*- питательная среда для культивирования и выделения легионелл Легионелбакагар (сухая), БУДРАГ (буферный угольно-дрожжевой агар) АСЕС-буфер.

Clostridium perfringens, *Clostridium sporogenes* – среда Китта-Тароцци, триптоза-сульфит циклосеринным агаре с селективной добавкой и Вильсона-Блера агаре. *Aspergillus fumigatus*- на Сабуро, Чапека бульоне, агаре, солевой раствор Хенкса с добавок.

Для роста тест-штаммов могут использоваться аналоги питательных сред в зависимости от производителей.

23. Используемые для испытаний питательные среды должны иметь паспорта с указанием даты изготовления, номер серии, срока годности, испытания на ростовые свойства.

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

В качестве нейтрализаторов ДВ из различных химических групп применяют для:

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

2) четвертичных аммониевых солей (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и другие), производные гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидинбиглюконат и другие) – 0,1-1,0% растворы лаурилсульфата натрия (сульфонол) или растворы лаурилсульфата натрия с 10% обезжиренного молока или универсальный нейтрализатор;

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

4) кислот – щелочи в эквивалентном количестве;

5) щелочей – кислоты в эквивалентном количестве;

6) спиртов – разведение в воде до не действующей концентрации;

7) композиционных средств – универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3%), сапонин (0,3-3%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%) или другие нейтрализаторы, рекомендуемые фирмами-производителями. Если в состав композиции входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия;

8) в экспериментах с вирусом полиомиелита в качестве нейтрализатора используют 80% инактивированную сыворотку крупного рогатого скота.

Подготовка тест-штаммов к выполнению испытаний. Тест-штаммы микроорганизмов хранят в музее живых культур в крио замороженном или в лиофилизированном виде или в виде посевов на плотных средах. Один раз в год проводят проверку микробиологических свойств, данные каждой проверки заносятся в журнал изучения свойств тест-штаммов микроорганизмов. Каждый штамм должен иметь паспорт, в котором записывается родовое и видовое название микроорганизма, номер штамма, откуда получен, отражаются все основные микробиологические свойства, условия культивирования и хранения.

25. По каждому штамму должны фиксироваться следующие данные: наименование коллекции или депозитария штаммов, из которого берется лиофилизированный штамм; таксономическое обозначение и справочный номер лиофилизированного штамма; номер партии лиофилизированного образца; дата ревитализации лиофилизированного образца; дата приготовления исходной культуры; подробности методов, применяемых для проверки чистоты и идентичности штамма, даты проверок и полученные результаты.

Перед проведением испытаний тест-штаммы выращивают при оптимальной температуре в течение 24-48 часов в зависимости от вида микроорганизма, чистоту выросшей культуры проверяют мазком, окрашенным по Граму. Для получения споровой формы культуру *Bacillus cereus* выращивают в термостате при 37°C в течение 5 суток с проведением контроля на наличие спор методом бактериологического мазка и подтверждением не

менее 70% (определяют мазком, окрашенным по Граму). Идентичность штамма должна подтверждаться посредством микробиологических идентифицирующих методов. Из выросшей агаровой культуры каждого тест-штамма делают взвесь в 0,9%-ном растворе натрия хлорида согласно стандарту мутности 10 ЕД.

Сертифицированные референс-штамм полиовируса Сэбин 1 типа служит в лаборатории источником аттестованного референс-вируса для приготовления рабочих запасов лабораторных стандартов контроля качества, а также вирусным материалом с известными титрами для проверки этих стандартов. После накопления референс-вируса тщательно перемешивают содержимое и разливают в ампулы, для дальнейшего хранения при -20°C до использования. Полученный запас вируса служит стандартом контроля качества лабораторной работы и референс-вирусом.

Для получения культуры штамма тест-микроорганизмов ампулу с лиофилизированной музейной культурой этого штамма вскрывают в асептических условиях, в БББ над кюветой с дезинфицирующим средством или над пропитанной дезинфицирующим средством салфеткой. Конец ампулы накрывается трехслойной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим средством, и обламывается пинцетом. Вскрытая ампула остается накрытой той же салфеткой в течение одной-двух минут, с последующим погружением салфетки в дезинфицирующий раствор. Стерильной пастеровской пипеткой в ампулу вливают 1,0 мл стерильной дистиллированной воды и оставляют в течение 30 минут при комнатной температуре для растворения лиофилизата и получения суспензии. Суспензию, приготовленную из музейной тест-культуры, засевают по 0,1 мл в пробирки со скошенной питательной средой (всего 10 пробирок).

Посевы на *Brusella* инкубируют в термостате при 37°C в течение 3-5 суток.

Посевы на *Vibrio cholerae* инкубируют в термостате при 37°C в течение 1-2 суток.

Посевы на *Francisella tularensis* инкубируют в термостате при 37°C в течение 4-7 суток.

Посевы на *Legionella pneumophila* инкубируют в термостате при 37°C в течение 3-5 суток.

Посевы на *M. Terra* инкубируют в термостате при 37°C в течение 7-14 суток.

Посевы на *M. Tuberculosis humanus* инкубируют в термостате при 37°C в течение 14-21 суток.

Сибирезвенную живую сухую вакцину СТИ для людей используют в виде взвеси, приготовленной разбавлением содержимого одной ампулы в 10 мл стерильного физиологического раствора или стерильной водопроводной воды.

26. Приготовление исходных культур (кроме микобактерий) – из лиофилизированного образца бактериального штамма готовится взвесь, из которой производится посев на питательный агар с целью получения отдельных колоний. Засеянные культуры инкубируют при оптимальной температуре в течение определенного для каждой культуры периода времени

(параметры культивирования различных штаммов приведены ниже). Выросшую культуру используют для проверки чистоты штамма и для получения основной культуры для опыта. Поверхность чашки Петри с питательным агаром равномерно засевают культурой тест-штамма в объеме 1,0 мл и инкубируют 18-24 часа при оптимальной температуре. На поверхность чашки Петри охлажденную после термостата с выросшим газоном культуры наносят 3 мл защитного раствора (10 % раствор глицерина) для замораживания и равномерно ресуспендируют стерильным шпателем по поверхности агара. По 100 мкл взвеси штаммов в защитном растворе с помощью дозатора переносят в криопробирки. Подготовленные таким образом взвеси штаммов в низкотемпературных пробирках хранят при температуре не минус 70°C. Чистота основной культуры проверяется путем посева на плотные питательные среды и микроскопией мазков, окрашенных по Граму.

27. Приготовление исходной культуры микобактерий – лиофилизированный образец микобактерий суспендируют в 100 мл защитного раствора. Смесь оставляют на 30 минут при 20°C и производят посев на агар Мидлбука. После инкубации в течение 21 дня при 36±1°C выросшую культуру используют для проверки чистоты штамма. Для предохранения от высыхания чашку необходимо заклеить парафильмом или упаковать в полиэтиленовый пакет. Исходную культуру готовят следующим образом: пипеткой переносят по 1 мл взвеси в 10 мл защитного раствора. Пробирки встряхивают, чтобы равномерно распределить взвесь культуры по стеклянным или керамическим бусинам. Затем смесь оставляют на 30 минут при 20°C. Избыток защитного раствора удаляют с помощью пипетки. Низкотемпературные пробирки помещают в морозильное устройство при температуре не выше -70°C на длительное время.

28. Приготовление рабочих культур.

1) Приготовление рабочей культуры бактерий (кроме микобактерий) – с помощью пинцета из исходной культуры берут отдельные бусины и суспендируют в питательном бульоне. Из этой суспензии посредством посевов на КСА (МПА) закладывают две субкультуры; одна из них хранится для внутреннего контроля до окончания исследования, а другая для подтверждения чистоты штамма и использования в работе. Обе субкультуры инкубируют при 36±1°C, 18-24 часа. Приготовление рабочей культуры *S. albicans* – из пробирок с исходной культурой пинцетом извлекают отдельные бусины и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой взвеси с помощью посевов на СЭА (среде Сабуро) получают две субкультуры: одна служит для внутреннего контроля до окончания исследования, вторая - предназначена для получения отдельных колоний с дальнейшим определением чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют при 30±1°C.

2) Приготовление рабочей культуры плесневых грибов - из пробирок с исходной культурой пинцетом извлекают отдельные бусины и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой взвеси посредством посевов на СЭА получают 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 $30\pm 1^\circ\text{C}$. Культура, предназначенная для обогащения, суспендируется в 10 мл бидистиллированной воды. Конидии отделяют с поверхности культуры стеклянным шпателем. Взвесь переносят в колбу Эрленмейера и слегка встряхивают со стеклянными бусинами в течение 1 минуты. Суспензию фильтруют через стекловолоконную вату.

3) Приготовление рабочей культуры *T. mentagrophytes* – используют культуры, выросшие на среде Сабуро. После инкубирования культур в течение 2 недель при $22\pm 1^\circ\text{C}$, на газон наносят 10 мл КСР. Затем колонии осторожно снимают петлей и переносят в следующие 10 мл КСР. Для удаления более крупных частичек, взвеси фильтруют через стекловолоконную вату.

4) Приготовление рабочей культуры микобактерий – отдельные бусины пинцетом извлекают из пробирок с исходной культурой и суспендируют в бидистиллированной воде. Из этой взвеси с помощью посевов на агар Мидлбука получают две субкультуры. Одна из них служит для обогащения, а вторую используют для подтверждения чистоты штамма. Обе субкультуры инкубируют при $36\pm 1^\circ\text{C}$. Для защиты от высыхания чашки заклеивают или помещают в полиэтиленовые пакеты. Через 21 день инкубации из культуры, предназначенной для обогащения, получают вторую субкультуру. Первая и/или вторая субкультура является рабочей культурой. Приготовление третьей субкультуры не допускается.

5) Приготовление рабочей дозы тест-вируса. Для титрования полиовируса Сэбин 1 типа оттаивают одну ампулу и готовят серию последовательных десятикратных разведений вирусосодержащего материала, назначая с $1:10$ (10^{-1}) до $1:1000000$ (10^{-6}). В качестве разбавителя при постановке реакции нейтрализации используют поддерживающую среду Игла МЕМ с 2% фетальной сывороткой плода коровы. Для приготовления разведений жидкость разливают по 0,9 мл в каждую пробирку, вносят стерильной пипеткой 0,1 мл суспензии вируса в первую пробирку (разведение 10^{-1}), пипетку отбрасывают, другой стерильной пипеткой осторожно, но тщательно перемешивают жидкость, избегая образования аэрозоля и переносят 0,1 мл в следующую пробирку, пипетку отбрасывают. Последовательно повторяют смешивание и перенос по 0,1 мл вируса в следующие разведения. Каждое разведение вирусосодержащей жидкости в объеме 0,1 мл вносят в 4 пробирки с культурой клеток, состояние культур проверяют под микроскопом. Учет производят на 5-7 сутки. Титром вируса считается наибольшее разведение вируса, вызывающее гибель половины зараженных пробирок- 1 тканевая цитопатическая доза (далее ТЦД_{50/0,1мл}). Если вирусный агент поражает 75-100% клеточного монослоя через 24-48 часов, то титр его примерно составит 10^6 ТЦД₅₀.

29. Приготовление взвесей из рабочих культур тест-штаммов микроорганизмов.

1) Приготовление культуры бактерий (кроме микобактерий) – из выросшей агаровой культуры с помощью микробиологической петли или стеклянного шпателя готовят взвесь культуры в 10 мл применяемого для разведения средства. Более крупные частицы удаляют осаждением или фильтрацией через стекловолоконную вату (за исключением культур I-II групп патогенности). Количество КОЕ в испытательной взвеси разведения доводят до концентрации $1,5 \times 10^9 - 8 \times 10^9$ /мл (от $1,5 \times 10^8$ до 8×10^8 /мл для дрожжей). Эту взвесь хранят при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и используют в течение 2 часов. Непосредственно перед проведением теста необходимое количество взвеси должно быть доведено до температуры, при которой проводится тест.

2) Приготовление культуры плесневых грибов - кандидии, отделенные с поверхности питательного агара с помощью стеклянного шпателя или петли, суспендируют в 10 мл разбавителя. Взвесь слегка встряхивают в течение 1 минуты в стеклянной колбе (100 мл) с 5-10 г стеклянных бусин диаметром 3-4 миллиметров (далее – мм), а затем фильтруют. Наличие фрагментов мицелия и прорастания спор должно быть не более 1 из 10 полей зрения, проверяют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. В случае обнаружения мицелия, отфильтрованную взвесь центрифугируют 20 минут при 2000 оборотах/в минуту, 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 взвеси доводится до $(1,5-8,0) \times 10^8$ мл, после чего взвесь может использоваться в течение 2 дней при температуре хранения $2-8^\circ\text{C}$. Перед употреблением испытательную взвесь необходимо встряхивать.

3) Приготовление культуры *T. mentagrophytes* – выросшие на среде Сабуро микроорганизмы суспендируют в пробирках с 10 мл NaCl и стеклянными бусами. Контролируемая взвесь должна содержать от 10 до 100 КОЕ/мл.

4) Приготовление культуры микобактерий - выросшую рабочую культуру смывают в 10 мл бидистиллированной воды, трехкратно центрифугируют 15 минут при 2000 оборотах/в минуту и промывают осадок в бидистиллированной воде. После последнего центрифугирования осадок разводят в 5 мл бидистиллированной воды и гомогенизируют. Количество КОЕ в взвеси должно быть в пределах $(1,5-8,0) \times 10^9$ /мл. Эта взвесь, разделенная на порции по 2 мл, при хранении $2-8^\circ\text{C}$ может использоваться в течение пяти дней. Перед использованием испытательную взвесь необходимо встряхивать.

5) Приготовление культуры *B. cereus*, *B. subtilis* – выросшие на МПА и КСА споровые микроорганизмы с помощью петли или шпателя суспендируют 10 мл применяемого для разведения средства. Взвесь помещают в пробирки, центрифугируют при 2000 оборотах/в минуту 20 минут, промывают не менее 4 раз. Количество спор КОЕ в испытательной взвеси доводят до $(1,5-8,0) \times 10^6$. Взвесь переносят во флакон и нагревают на водяной бане при 75°C в течение 10 минут. Путем микроскопии необходимо

убедиться в отсутствии вегетативных клеток и прорастании спор. Взвесь можно использовать в течение 2 дней при температуре хранения 2-8°C.

Определение исходного числа микроорганизмов - подготовленные испытательные взвеси доводят физиологическим раствором до 100 КОЕ/мл. Взвеси гомогенизируют. По 0,1 мл полученной взвеси берут для контрольного определения, засевают на 3 чашки с питательным агаром и инкубируют при оптимальной для каждого вида микроорганизмов температуре 24 часа (*S. albicans* в течение 42-48 часов, *B. subtilis* – в течение 7-9 дней, *M. terrae* – в течение 21 дня). При отсутствии пробирок с завинчивающимися крышками нужно для предохранения от высыхания питательные среды следует заклеить или укрыть в полиэтиленовые пакеты. Количество КОЕ на каждой питательной среде подсчитывают и заносят в протокол, как и среднее количество (N) КОЕ дублирующих определений.

Для приготовления бактериальной взвеси культуры бактерий 2 групп патогенности 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 (он соответствует 210 микробных тел в 1 мл).

30. Подготовка рабочих растворов дезинфицирующих средств к испытаниям.

1) Для определения бактерицидной, туберкулоцидной и фунгицидной активности рабочие растворы готовят на нестерильной дехлорированной водопроводной воде (соответствующей действующим нормативным документам, регламентирующим качество питьевой воды). При испытаниях средств на наличие вирулицидной активности растворы дезинфектантов готовят на стерильной водопроводной дехлорированной воде.

2) Температура растворов испытываемых дезинфектантов должна быть в пределах от +18° до +20°C (если по условиям эксперимента не рекомендована другая температура), независимо от температуры окружающей среды.

3) При испытании средств, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и др. использовать рабочие растворы только после полного растворения дезсредства.

4) Кратность постановки экспериментов должна быть не менее трех (при условии получения однотипных результатов), при необходимости статистической обработки – не менее восьми.

5) Все опыты должны сопровождаться контролями: полноты нейтрализации дезинфектанта, жизнеспособности культуры тест-штамма, контроля контаминации тест-объекта, а при работе с тест-вирусом – контролями культуры клеток или лабораторных животных (белых мышей). Контроль тест-вирусов, а также необходимо параллельно использовать внутилабораторный контроль (ВЛК) в таких же условиях как испытуемое ДС, в качестве ВЛК используют дезинфицирующее средство с заведомо известными свойствами и зарегистрированными на территории Республики Казахстан.

6) Испытываемые средства перед, во время и после испытаний должны храниться в соответствии с требованиями технических условий.

7) При испытаниях дезинфицирующих средств следует строго соблюдать рекомендуемые меры индивидуальной защиты (перчатки, респираторы и другое).

8) Для имитации органического загрязнения к испытываемому рабочему раствору средства добавляют 0,03% альбумина или 20% лошадиной сыворотки, которые добавляют непосредственно перед началом эксперимента. Для имитации повышенного органического загрязнения добавляют 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов. При работе с тест-вирусами для имитации органического загрязнения использую 40% инактивированной сыворотки при разработке режимов обеззараживания раковин, ванн или при разработке режимов обеззараживания унитазов - 80%. Возможно также использование вирусосодержащей фекальной эмульсии, которую наносят на поверхности из кафеля или фаянса в экскрементах с вирусами, выделяющимися из организма с фекалиями.

Глава 3. Методы определения эффективности дезинфицирующих средств.

31. Проведение тестов in vitro.

При определении бактериостатической и микостатической эффективности используют тест-штаммы *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* и *C. albicans*.

В пробирки вносят по 5 мл растворов испытываемого дезинфектанта и казеин-соево-пептонный раствор; добавляют нейтрализующее средство двойной концентрации.

Для определения бактериостатической эффективности в пробирки засевают 0,1 мл взвеси тест-штаммов в концентрации $1,5 \times 10^9$, для фунгицидной эффективности взвесь *C. albicans* в концентрации 8×10^9 /мл. Учет результатов производят после 48-часовой инкубации при $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (для *C. Albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ от 3 до 5 дней).

Оценка полученных результатов проводится путем сравнения темпов замедления роста в сериях тестов без добавления и с добавлением нейтрализующего средства.

Мерой, замедляющей размножение микроорганизмов (угнетающая концентрация), считается наибольшее разведение дезсредства, подавляющее рост микроорганизмов, когда не происходит помутнения суспензии («+» соответствует росту микроорганизмов; «-» отсутствие роста микроорганизмов).

Для контроля жизнеспособности тест-штаммов (контроль 1) 0,1 мл исходной взвеси тест-штамма смешивают с 9,9 мл стерильной воды и делают высев на соответствующую питательную среду.

Контроль нейтрализации (контроль 2) и нетоксичности нейтрализующего средства (контроль 3) проводят следующим образом: к 1 мл проверяемого дезсредства, взятого в максимальной концентрации, добавляют 9 мл нейтрализатора и через 5 минут добавляют 0,1 мл нескольких 10-кратных разведений (для *C. albicans* до 10^{-3}) тест-штамма. Через 60 минут по 0,1 мл засевают на 2 чашки соответствующей среды. Также по 0,1 мл засевают на 2

чашки из подготовленных разведений суспензии на соответствующие питательные среды и инкубируют в термостате при 36 ± 1 °С в течение 24-48 часов.

Если в эксперименте нейтрализация окажется недостаточная и произойдет замедление или полное угнетение роста микроорганизма по сравнению с контролем жизнеспособности штаммов, следует поменять нейтрализатор.

Контроль токсичности нейтрализатора проводится также как и контроль нейтрализации, только вместо раствора проверяемого средства берется стерильная дистиллированная вода.

32. Определение бактерицидной, фунгицидной и спороцидной эффективности в качественном эксперименте с суспензией необходимо тогда, когда в последующем количественном эксперименте с суспензией должны проверяться не все заданные микроорганизмы, а только некоторые наиболее стойкие грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы: *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, *B. cereus*, *C. albicans*.

К 0,1 мл взвеси тест-штаммов концентрацией $1,5\times 10^9$ /мл (*C. albicans* в концентрации 8×10^9 /мл) добавляют 10 мл соответствующего раствора дезсредства и обеззараживают в течение необходимого времени. Затем взвесь тест-штамма с проверяемым средством снова перемешивают. Отбирают по 0,1 мл и переносят в пробирки с 10 мл КСР или МПА или бульона Хоттингера (при необходимости с нейтрализующим средством), инкубируют в течение 48 часов при 36 ± 1 °С (*C. albicans* при 30 ± 10 °С до 5 дней, *B. cereus*– 7-8 дней).

Оценка полученных результатов ведется по помутнению бульонных культур: («+» соответствует росту микроорганизмов; «-» отсутствие роста микроорганизмов).

Результаты качественного эксперимента по результатам эффективных и неэффективных соотношений концентрации и времени воздействия для всех взятых в опыт микроорганизмов регистрируют в протоколе проверки в табличной форме.

33. Определение бактерицидной и фунгицидной эффективности в количественном суспензионном методе ведется с использованием бактерий (кроме микобактерий) и грибов.

Микроорганизмы, используемые при тестировании: *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *Ps. aeruginosa* и *C. albicans*. Среди грамотрицательных и грамположительных бактерий в каждом случае следует выбирать наиболее устойчивый микроорганизм по результатам качественных экспериментов с суспензиями.

В образец испытуемого дезсредства вносится тест-штамм и выдерживается при 20 ± 1 °С в течение различных экспозиций. После выбранных экспозиций смесь немедленно нейтрализуют соответствующим способом, чтобы проверить бактерицидность или фунгицидность. В каждом образце определяют количество живых микроорганизмов и вычисляют их сокращение.

Обработка результатов ведется путем учета чашек, 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:

$$\text{LogRF} = \log (\text{КОЕ } K_0) - \log (\text{КОЕ } D),$$

где: КОЕ K_0 – количество КОЕ на мл без воздействия средства,

КОЕ D – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

34.В таблицах протокола должны быть приведены значения КОЕ по ступеням разведения, логарифм $\text{Log} (\text{КОЕ } D)$ и значения RF.

1) Метод разбавления и нейтрализации.

0,1 мл взвеси тест-штамма смешивают с 9,9 мл раствора проверяемого ДС. После необходимой экспозиции смесь снова тщательно перемешивают и 0,5 мл переносится в 4,5 мл нейтрализующего вещества. После нейтрализации в течение 5 минут готовят разведения от 10^{-1} до 10^{-3} . Из смеси с нейтрализатором по 0,1 или по 0,5 мл производят посев шпателем на КСА, МПА или аналогичный агар поддерживающий рост микроорганизмов, агар Хоттингера (*S. albicans* – на среду Сабуро). Из каждого разведения делают по 2 посева.

Для контроля взвесь тест-штамма смешивают с 9,9 мл стерильной воды. После истечения необходимой экспозиции готовят разведения и посева на соответствующие питательные среды. Чашки инкубируют в течение 42-48 часов при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (*S. albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 5 дней).

Для установления влияния белковой нагрузки количественный эксперимент с взвесью проводят с проверяемыми растворами продукта, содержащими 0,03% альбумина или 20% лошадиной сыворотки, которые добавляют непосредственно перед началом эксперимента.

Для имитации повышенного органического загрязнения количественный эксперимент проводят с растворами проверяемого средства, которые содержат 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов, которые также добавляют непосредственно перед началом эксперимента. Для оценки влияния дополнительной нагрузки эти исследования проводят параллельно.

2) Метод мембранной фильтрации.

0,1 мл взвеси тест-штамма смешивают с 9,9 мл раствора проверяемого ДС. После истечения необходимой экспозиции смесь перемешивают, переносят по 0,5 мл на два отдельных мембранных фильтра установки для фильтрации, содержащей 50 мл промывочной жидкости и затем фильтруют. При этом не следует превышать временной интервал в 1 минуту, отводимый на перенос и фильтрование (превышение этого времени должно быть отмечено в протоколе проверки). Промывку производят в не менее чем 150 мл и не более, чем в 500 мл промывочной жидкости. Затем мембраны переносят на питательные среды так, чтобы не было попаданий воздуха между мембраной и поверхностью питательной среды. Чашки инкубируют в течение 42-48 часов при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (*S. albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 5 дней).

Эксперименты с белковой нагрузкой и повышенным органическим загрязнением проводят также как и в способе разбавления и нейтрализации.

Для контроля жизнеспособности тест-штамма (контроль 1) 0,1 мл взвеси тест-штамма смешивают с 9,9 мл стерильной воды. После необходимой экспозиции и соответствующего разбавления дезсредства промывочной жидкостью суспензию фильтруют описанным выше методом, переносят на питательную среду. Так же выполняют контроль нейтрализации (контроль 2) и нетоксичности нейтрализующего средства (контроль 3), см. выше.

35. Количественный суспензионный метод с использованием микобактерий. Образец дезсредства смешивается со взвесью микобактерий и выдерживается при 20°C необходимые экспозиции, затем смесь нейтрализуют соответствующим обоснованным способом для проверки существующей туберкулоцидности (*Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* H37RV) или микобактерицидности (*Mycobacterium avium*). В каждом образце определяют количество живых микроорганизмов и рассчитывают их фактор редукции. Основным методом является способ разбавления и нейтрализации (см. выше). Эксперименты с органической нагрузкой определяются условиями применения исследуемого дезсредства. Особенность является инкубация чашек с питательной средой (картофельно-глицериновом бульон, среда Петраньяни) в течение 21 дня при $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Эксперименты с белковой нагрузкой и повышенным органическим загрязнением проводят также как и в способе разбавления и нейтрализации.

Для контроля взвесь тест-штамма смешивают с 9,9 мл стерильной воды. После истечения необходимой экспозиции готовят разведения и высевают на соответствующие питательные среды. Чашки инкубируют в течение 42-48 часов при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (*C. albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 5 дней).

Для установления влияния белковой нагрузки количественный эксперимент с взвесью проводят с проверяемыми растворами продукта, содержащими 0,03% альбумина или 20% лошадиной сыворотки, которые добавляют непосредственно перед началом эксперимента.

Для имитации повышенного органического загрязнения количественный эксперимент проводят с растворами проверяемого средства, которые содержат 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов, которые также добавляют непосредственно перед началом эксперимента. Для оценки влияния дополнительной нагрузки эти исследования проводят параллельно.

36. Испытания дезсредств в условиях, приближенных к практическим.

Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей в помещениях, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и других объектов.

При определении дезинфицирующей активности средств используют тест-поверхности из различных материалов. Обеззараживание осуществляют способами протирания или орошения. На тест-поверхности размером 10×10 см (в качестве модельных поверхностей служат матовые глазурованные плитки для операционных, или стеклянные плитки) наносят по 0,5 мл 2-х млрд взвеси тест-штаммов (или вирусосодержащей жидкости с титром не менее $10^{6,5}$ ТЦД₅₀), равномерно растирают по поверхности, подсушивают, затем обрабатывают дезинфицирующим средством. Контрольные поверхности

обрабатывают водой. Через определенное время марлевыми салфетками, смоченными нейтрализатором, с тест-поверхностей берут смыв, отбивают их в течение 10 минут во флаконе с бусами диаметром 3-4 мм в нейтрализаторе, затем делают высевы на питательные среды (при определении вирулицидной активности заражают культуру клеток или белых мышей), посеvy помещают в термостат. Учет результатов проводят через 2-21 суток в зависимости от вида тест микроорганизма.

При определении эффективности режима дезинфекции технологического оборудования в различных отраслях пищевой промышленности в качестве тест-поверхностей используют стекло и металл, которые контаминируют санитарно-показательными микроорганизмами. Обеззараживание осуществляют способом погружения и мытья поверхностей.

Для имитации практических условий к испытательной суспензии непосредственно перед проведением проверки добавляют 0,03% альбумина (белковая нагрузка) или 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов (повышенная белковая нагрузка). При работе с тест-вирусами для имитации органического загрязнения используют 40% инактивированной сыворотки при разработке режимов обеззараживания раковин, ванн или при разработке режимов обеззараживания унитазов-80%. Возможно также использование вирусосодержащей фекальной эмульсии, которую наносят на поверхности из кафеля или фаянса в экскрементах с вирусами, выделяющимися из организма с фекалиями.

Для контроля жизнеспособности тест-штаммов (контроль 1) зараженные поверхности вместо раствора дезсредства обрабатывают стерильной ДВ. С поверхности берут смыв, обрабатывают в нейтрализаторе и делают посев на соответствующую питательную среду.

Контроль 2 для подтверждения успешности нейтрализации, проводят смешиванием 0,2 мл раствора проверяемого дезсредства с последующим добавлением 0,1 мл испытательной суспензии в склянке (на 200 мл) со 100 мл нейтрализующей жидкости и стеклянными бусинами (диаметром 3-4 мм). Отмывку проводят в течение 2 минут, делают разведения (10^{-1} - 10^{-4}) в течение не более 30 минут. От непосредственного состава нейтрализующей жидкости и приготовленных разведений делают высевы на соответствующие питательные среды по 0,1 мл и растирают с помощью шпателя.

Контроль 3 служит для обнаружения возможной токсичности нейтрализующего средства. 0,1 мл взвеси тест-штамма вносят в 100 мл нейтрализующей жидкости (во флаконе 200 мл) со стеклянными бусинами, отмывают в течение 2 минут. В течение не более 30 минут приготавливают разведения (10^{-1} - 10^{-4}). От нейтрализующей жидкости (непосредственный состав) и разведений делают высевы на соответствующие питательные среды по 0,1 мл и растирают с помощью шпателя. Чашки с посевами инкубируют 48 часов при $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ (С. Albicans при $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 5 дней).

Показатель эффективности обеззараживания – не менее 99,99%, для средств с вирулицидной активностью – не менее 100%.

Обработка результатов ведется путем учета чашек, 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:

$$\text{LogRF} = \log (\text{КВЕ } K_0) - \log (\text{КВЕ } D),$$

где: КВЕ K_0 – количество КОЕ на мл без воздействия средства,

КВЕ D – количество КОЕ на мл после воздействия средства.

В таблицах протокола должны быть приведены значения КОЕ по ступеням разведения, логарифм $\text{Log} (\text{КВЕ } D)$ и значения RF.

На первом этапе выполнения эксперимента на каждую продолжительность воздействия (экспозицию) и каждый микроорганизм для составов с разной концентрацией дезинфицирующего средства используют по одному тест-носителю. Контроль 1 на каждое время и микроорганизм проводится не менее чем с тремя тест-носителями и в результате рассчитывается среднее значение.

Во втором эксперименте на каждую экспозицию каждый раз используют по три тест-носителя на микроорганизм с не менее, чем двумя концентрациями дезинфекционного средства (в эффективном и неэффективном диапазоне) с учетом результатов первого этапа.

В третьем эксперименте на каждую экспозицию и микроорганизм используют по три тест-носителя, но только в эффективном диапазоне сочетания концентрации и времени воздействия.

По каждому тест-носителю в первом, втором и третьем эксперименте отдельно рассчитывается LogRF на основании средних значений от соответствующего контроля 1.

По шести значениям RF второго и третьего этапа выполнения эксперимента рассчитывается среднее значение. Отклонение значений RF отдельных тест-носителей не должно превышать 1 Log от соответствующего среднего значения.

Все эксперименты следует выполнять с соответствующим контролем 1. Контроли 2 и 3 необходимы в первом этапе выполнения эксперимента.

37. Для оценки фунгицидной эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей из древесины используют микроорганизмы: *S. albicans*; *T. mentagrophytes*.

Для подготовки тест-носителей плоские деревянные палочки в течение 24 часов вымачивают в бидистиллированной воде, а затем стерилизуют паром. Тест-носители укладывают в стеклянную чашку и заливают 2-х млрд взвесью тест-штамма. После выдержки в течение 10 минут, тест-носители выкладывают в стеклянную чашку с фильтровальной бумагой и высушивают в термостате при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Зараженные и высушенные обеззараживают испытуемым дезраствором в объеме не менее 15 мл (по два тест-носителя на каждую концентрацию и продолжительность воздействия), при этом тест-носители двигают в чашках туда и обратно не менее 2-х минут. Затем деревянные палочки устанавливают вертикально к стенкам стеклянных стаканов и оставляют их там до истечения требуемого времени воздействия.

После экспозиции палочки дважды ополаскивают в МПБ (при необходимости с нейтрализующим средством), с помощью пинцета засеваются на МПА или аналогичный агар поддерживающий рост микроорганизмов (палочки перемещают по поверхности питательной среды туда и обратно). Один из тест-носителей должен находиться непосредственно над конденсатом, а второй посередине поверхности питательной среды.

В качестве контроля роста следует использовать зараженные тест-носители, обработанные стерильной ДВ при наибольшей экспозиции.

Питательные среды, засеянные *S. albicans*, инкубируют в течение 5 дней при $30\pm 1^\circ\text{C}$; зараженные *T. mentagrophytes* при $22\pm 1^\circ\text{C}$ – 21 день.

Полученные результаты необходимо заносить в протокол следующим образом:

- отсутствие роста;

или

- рост КОЕ

Для имитации практических условий к испытательным суспензиям непосредственно перед проведением проверки добавляют 0,03% альбумина (белковая нагрузка) или 0,3% альбумина и 0,3% бараньих эритроцитов (повышенная белковая нагрузка). При работе с тест-вирусами для имитации органического загрязнения использую 40% инактивированной сыворотки при разработке режимов обеззараживания раковин, ванн или при разработке режимов обеззараживания унитазов-80%. Возможно также использование вирусосодержащей фекальной эмульсии, которую наносят на поверхности из кафеля или фаянса в экскрементах с вирусами, выделяющимися из организма с фекалиями.

38. Для оценки эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании белья, одежды используют бязевые тест-объекты размером 2×2 см с органическим загрязнением и без него. Для имитации загрязнения кровью, сывороткой крови, гноем и др. к взвеси тест-штаммов микроорганизмов добавляют 40% инактивированной сыворотки. Для имитации загрязнения фекалиями добавляют 40% фекальной эмульсии. При испытаниях на наличие вирулицидной активности в качестве органического загрязнения используют 80% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота. Полученной смесью пропитывают бязевые тест-объекты. Белье, в разные слои которого закладывают мешочки с тест-объектами, обсемененными тест-культурой, замачивают в дезинфицирующем растворе. Контролем служит таким же образом подготовленное белье, погруженное в воду. Тест-объекты через определенные интервалы времени извлекают из мешочков, отбивают их в растворе нейтрализатора, затем помещают в пробирки с питательными средами и инкубируют в термостате. Вирусосодержащей жидкостью заражают чувствительные клеточные культуры или белых мышей. Учет результатов проводят через 2-28 дней в зависимости от вида тест-штамма микроорганизма.

Показатель эффективности – не менее 100%.

39. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании выделений:

1) Испытания при обеззараживании мочи проводят следующим образом: берут несколько пробирок, наливают в них по 9 мл мочи, добавляют по 1 мл взвеси тест-штамма концентрацией 1×10^9 микробных клеток (м.к.) в 1 мл. Далее к моче добавляют растворы дезсредства. По истечении времени воздействия пипеткой берут по 1 мл опытной смеси и переносят в нейтрализатор, а затем помещают в пробирки с 5 мл питательного бульона. После тщательного перемешивания 1 мл переносят во вторую пробирку с питательным бульоном, далее делают посева (из первой и второй пробирок) по 0,1 мл на твердые питательные среды и ставят в термостат. При контаминировании мочи микобактериями отобранную пробу центрифугируют и 0,2 мл осадка засевают на питательные среды. Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к моче стерильной воды взамен испытуемого средства. Показатель эффективности – 100%.

2) Испытание эффективности средств при обеззараживании фекалий проводят следующим образом: 20 г фекалий растирают в ступке и добавляют 80 мл воды. Полученную эмульсию фильтруют, разливают в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл взвеси тест-штамма *E. coli* концентрацией 1×10^9 м.к. в 1 мл или испытуемый тест-вирус. Приготовленную смесь заливают раствором дезинфектанта или вносят сухой дезинфектант, тщательно перемешивают. Через определенное время из каждой пробы отбирают по 0,5 мл жидкости и переносят в пробирки с 4,5 мл жидкой питательной среды. После ряда серийных разведений из каждой пробирки производят высев на чашки Петри с питательным агаром или заражают культуру клеток. Результаты учитывают через двое суток. Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением к фекальной эмульсии стерильной воды вместо дезинфицирующего средства. Показатель эффективности – не менее 100%.

40. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании объектов с посевами микроорганизмов.

Используют объекты с посевами тест-штаммов микроорганизмов: 2 чашки с посевами каждого тест-штамма на питательный агар, 2 пробирки с посевами каждого тест-штамма в питательный бульон. Обеззараживание осуществляют способом погружения в испытуемый раствор дезсредства. Через определенные промежутки времени (экспозиции) из объектов с посевами берут стерильными марлевыми тампонами, смоченными нейтрализатором, смывы для выявления жизнеспособных микроорганизмов, оставшихся после воздействия ДС. Тампоны отбивают в пробирках (с бусами) с нейтрализатором или тщательно перемешивают на вортексе, в течение 10 минут, затем делают высевы на питательные среды и помещают их в термостат. Учет результатов проводят через 2-28 суток в зависимости от вида тест-штамма микроорганизма.

Показатель эффективности – не менее 100%.

41. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании изделий медицинского назначения. Изделия медицинского назначения из металлов, стекла, резин, пластмасс контаминируют (заполняя полости или каналы) взвесью тест-штамма концентрацией 1×10^9 м.к. в 1 мл с

добавлением 40%-ной инактивированной лошадиной сыворотки или без нее (при наличии у средства фиксирующих свойств), при оценке вирулицидной активности – применяют взвесь вирусов. После подсушивания изделия погружают в раствор испытуемого средства. Параллельно для контроля изделия погружают в воду. Через определенные промежутки времени 5-15-30 минут и т.д. крупные изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой, пропитанной раствором нейтрализатора или физиологическим раствором, берут смыв для контроля эффективности обеззараживания путем посева смывной жидкости на дифференциально-диагностические среды, а тест-вируса – путем заражения чувствительной культуры клеток. Мелкие изделия полностью погружают в пробирки с питательными средами и помещают в термостат. Каналы изделий промывают питательной средой, собирая ее в стерильные пробирки, и помещают в термостат (при оценке вирулицидной активности смывом заражают культуру клеток).

Показатель эффективности – не менее 100%.

42. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании посуды (столовой). Используют набор столовой посуды (2 тарелки, стакан или чашка, 2 ложки, вилка, нож). Обеззараживание осуществляют способом погружения в испытываемый раствор дезсредства. Для имитации загрязнения посуды остатками пищи к 1 мл взвеси тест-штамма концентрацией 2×10^9 м.к. в 1 мл добавляют 10 г манной каши. При испытаниях на наличие вирулицидной активности к вирусосодержащей жидкости добавляют 80% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота. Посуду с остатками пищи и без нее, обсемененную тест-штаммом, погружают в дезинфицирующий раствор (для контроля посуду погружают в такой же объем стерильной дистиллированной воды и через определенные промежутки времени (экспозиции) с нее берут стерильными марлевыми салфетками, смоченными нейтрализатором, смывы для выявления оставшихся после обработки жизнеспособных микроорганизмов. Салфетки отбивают в пробирках (с бусами) с нейтрализатором или тщательно перемешивают на вортексе, в течение 10 минут, затем делают посева на питательные среды (в экспериментах с вирусами заражают культуру клеток или белых мышей) и помещают их в термостат. Учет результатов проводят через 2-28 суток в зависимости от вида тест-штамма микроорганизма. Показатель эффективности – не менее 100%.

43. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании предметов ухода за больными, игрушек. Предметы ухода за больными и игрушки из различных материалов инфицируют взвесью тест-штамма концентрацией 1×10^9 м.к. в 1 мл с добавлением 40%-ной инактивированной сыворотки или без нее. Обеззараживание осуществляют способами погружения, протирания, орошения (крупные игрушки). После подсушивания тест-объекты погружают в раствор средства или протирают салфеткой, смоченной раствором нейтрализатора, с них берут смывы для контроля эффективности обеззараживания путем посева смывной жидкости на дифференциально-диагностические среды. При наличии

каналов через них пропускают питательную среду, которую собирают в пробирку и помещают в термостат. При оценке вирулицидной активности заражают чувствительную культуру клеток. Показатель эффективности – не менее 100%.

44. Оценка эффективности антимикробных тканей методом «агаровых пластин». В растопленный и охлажденный до 45°C 2% мясо-пептонный агар вносят взвесь тест-штамма, содержащую 1×10^8 м. к. в 1 мл, и разливают эту смесь в чашки Петри. На поверхность застывшего агара накладывают тест-образцы тканей размером 2×2 см. Контролем служат образцы тканей, не содержащие антимикробных компонентов. Посевы помещают в термостат при 37°C. Учет результатов производят через 24-48 часов по величине задержки роста микроорганизма (в мм), измеряемых от края образца до границы роста микроорганизма вокруг тест-образца. Опыты повторяют не менее трех раз (при условии получения однотипных результатов). Показатель эффективности – зона задержки роста не менее 4 мм.

45. Оценка антимикробной активности лаков, красок и др. На тест-поверхности, окрашенные антимикробной краской или покрытые антимикробным лаком, наносят взвесь тест-штамма микроорганизма концентрацией 1×10^8 м.к./мл. После дезинфекционной выдержки в течение определенного времени с поверхности берут смыв и оценивают эффективность путем расчета процента обеззараживания опытного образца по сравнению с контролем (поверхность, на которой нет краски или лака). Показатель эффективности – не менее 90%.

46. Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании воздуха в помещении. Исследования проводят в испытательных камерах. Предварительно камеру моют с применением моющего средства, остатки которого смывают водопроводной водой и включают бактерицидный облучатель. 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 объемом 0,5-2 м³ распыляют суспензию тест-штамма (или вируссодержащую жидкость) в количестве, достаточном для создания в воздухе концентрации микроорганизмов $2,1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Аэрозоль создают с помощью распылительной аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80% частиц с дисперсностью 10+5 мкм, 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. Контроль результатов обеззараживания воздуха осуществляют седиментационным или фильтрационным способом. Показатель эффективности – 99,9%.

Оценка эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании воздуха в помещении. В камере объемом 0,5-2 м³ распыляют суспензию тест-штамма (или вируссодержащую жидкость) в количестве, достаточном для создания в воздухе концентрации микроорганизмов $2,1 \times 10^4$ КОЕ/мл. Аэрозоль создают с помощью аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80% частиц дисперсностью 20 ± 5 мкм. В камеру помещают вентилятор для предотвращения быстрого оседания тест-штаммов микроорганизмов. Контроль результатов обеззараживания воздуха осуществляют седиментационным или фильтрационным способом. Показатель эффективности – 99,9%.

47. Методы определения эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания воды питьевой и воды плавательных бассейнов, соответствующей требованиям действующих нормативных документов. Дезинфицирующие средства должны обеспечивать уничтожение в воде тест-штаммов бактериальной и вирусной природы.

1) Характеристика тест-штаммов.

Оценку эффективности обеззараживания питьевой воды и воды плавательных бассейнов проводят с использованием следующих тест-штаммов микроорганизмов: кишечная палочка.

2) Приготовление культур тест-штаммов.

E. coli используют в виде суточной бульонной культуры, концентрация бактерий в которой составляет 1×10^9 м. к. в 1 мл;

S. aureus используют в виде суточной бульонной культуры, концентрация бактерий в которой составляет 1×10^9 м.к. в 1 мл;

Разведенный референтный штамм сибиреязвенного микроба (СТИ), содержащей 1×10^8 - 10^9 спор в 1 мл;

Культуру *V. cereus* используют в виде взвеси спор, содержащей 1×10^8 спор в 1 мл;

Бактериофаг кишечной палочки MS2 используют в виде бульонной культуры освобожденной от обломков бактерий и нелизированных бактерий, и имеющей титр не менее 10^{10} бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл.

3) Проведение испытаний.

В качестве исходной воды используют водопроводную или природную воду, показатели качества которой соответствуют назначению испытываемого дезинфицирующего средства. Водопроводную воду перед использованием дехлорируют нагреванием при температуре 60°C в течение 30-40 минут.

Исходную воду заливают в емкости с нижним тубусом и контаминируют культурами тест-штаммов из расчета 10^5 - 10^6 КОЕ в 1 л. После внесения расчетной дозы микроорганизмов воду тщательно перемешивают и отбирают пробы для определения концентрации исходного заражения воды микроорганизмами.

Дезинфицирующее средство вносят в емкость с зараженной водой в необходимых концентрациях и тщательно перемешивают. Через определенные промежутки времени при соблюдении условий стерильности отбирают пробы

воды объемом 0,5 л в стерильные флаконы с внесенным в них нейтрализатором и определяют микробиологические показатели обеззараженной воды.

4) Определение микробиологических показателей исходной воды. Общее микробное число исходной воды определяют в соответствии с требованиями действующих нормативных документов в регламентирующем качестве питьевой воды. Исходное заражение воды бактериями и спорами контролируют следующим образом. Из емкости отбирают 1-3 пробы воды (в зависимости от объема емкости) по 3-5 мл. Для каждой пробы делают по 3-4 последовательных десятикратных разбавления в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде, которые затем фильтруют по 1 мл через мембранные фильтры со средним размером пор 0,5 мкм, помещают на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашках Петри и инкубируют в термостате при $37\pm 2^\circ\text{C}$ (при исследовании воды плавательных бассейнов допускается использовать классический бактериологический метод). Учитывают количество выросших на фильтрах колоний и рассчитывают концентрацию бактерий в 1 л. Исходное заражение воды бактериофагом контролируют следующим образом. Из емкости отбирают 1-3 пробы воды (в зависимости от объема емкости) по 5-10 мл, делают по 3-4 последовательных десятикратных разбавления, в которых число БОЕ определяют методом агаровых слоев Грация и рассчитывают число БОЕ в 1 л воды.

5) Определение микробиологических показателей обеззараженной воды.

Общее микробное число воды и число бактерий группы кишечных палочек (коли-индекс) определяют в соответствии с действующим нормативным документам, регламентирующим качество питьевой воды.

Результат анализа при определении общего микробного числа выражают КОЕ в 1 мл воды.

Результат анализа при определении коли-индекса выражают числом бактерий группы кишечных палочек в 1 л воды.

Концентрацию золотистого стафилококка, спор сибиреязвенных вакцинных штаммов или спор *V. cereus* в воде определяют методом мембранных фильтров с использованием в качестве плотной питательной среды мясопептонного или казеинового агара.

Результат анализа выражают числом бактерий золотистого стафилококка, спор сибиреязвенных вакцинных штаммов или спор *V. cereus* в 1 л воды.

Титр бактериофага кишечной палочки MS2 определяют методом обогащения.

Результат анализа выражают числом БОЕ в 1 л воды.

Оценка результатов испытаний. Показателем эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания воды, является 100%-ное снижение обсемененности воды, контаминированной тест-штаммами, при величине общего микробного числа не более 50 в 1 мл.

48. Методы оценки эффективности кожных антисептиков. Оценку эффективности обеззараживающего действия кожных антисептиков проводят на кожных покровах испытуемых в отношении естественной и искусственной обсемененности кожных покровов. Для выделения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов из смывов, взятых с кожи кистей рук, используют общепринятые питательные среды.

Для нейтрализации антимикробного действия кожных антисептиков применяют следующие нейтрализаторы: для средств, содержащих окислители (йод, хлор, перекись водорода), растворы тиосульфата натрия 0,5-1% концентрации; для средств, содержащих спирты - стерильную водопроводную воду; для средств, содержащих катионные поверхностно-активные вещества - сульфанола или универсальный нейтрализатор, содержащий твин, гистидин, лецитин и др.; для композиционных средств, содержащих разные действующие вещества - универсальный нейтрализатор.

Участники испытаний должны быть не моложе 18 лет, здоровы, не иметь повреждений на пальцах. Их ногти должны быть чистыми и коротко подстриженными. За неделю до начала эксперимента участники не должны использовать вещества с антибактериальным действием.

1) Метод оценки эффективности кожных антисептиков, предназначенных для обработки рук хирургов.

Определение вирулицидной активности кожных антисептиков. Для изучения вирулицидной активности кожных антисептиков используется суспензионный метод. С этой целью используют в качестве тест-вирусов полиовирус и аденовирус. Время дезинфекционной выдержки согласно инструкции по применению ДС изготовителя. Эффективность - снижения вируса не менее, чем на $4 \log_{10}$.

Руки испытуемых, включая запястья и предплечья, в течение двух минут моют теплой проточной водой и туалетным мылом, а затем высушивают стерильной марлевой салфеткой. Затем, до обработки кожным антисептиком, с одной руки (контрольной) берут смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной физиологическим раствором. После этого на сухие кисти обеих рук испытуемых наносят определенное количество изучаемого антисептика и проводят обработку путем втирания его в кожу кистей рук между пальцами, а также запястий и предплечий (в режиме обработки для конкретного кожного антисептика). Через определенное время марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором, берут смыв с кожи рук испытуемых, салфетки отбивают в течение 10 минут в пробирке с бусами в нейтрализаторе или тщательно перемешивают на вортексе. Затем после каждого смыва делают высеивание на питательные среды и помещают посеивания в термостат. Учет результатов проводят через 2 суток по бактерицидной эффективности, вирулицидной эффективности наблюдения может продолжаться в течение 2-х месяцев и более.

Критерий эффективности - снижение общей микробной обсемененности кожи рук на 100%.

Для оценки эффективности антисептика при искусственной контаминации на руки испытателя наносят 0,2 мл бульонной суточной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 10^5 КОЕ/мл, *C. albicans* - в концентрации 8×10^9 /мл. Затем, до обработки кожным антисептиком, с одной руки (контрольной) берут смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной физиологическим раствором. После этого наносят определенное количество изучаемого антисептика и проводят обработку путем втирания его в кожу кистей рук между пальцами, а также запястий и предплечий (в режиме обработки для конкретного кожного антисептика). Через определенное время марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором, берут смыв с кожи рук испытуемых, салфетки отбивают в течение 10 минут в пробирке с бусами в нейтрализаторе или тщательно перемешивают на вортексе. Затем после каждого смыва делают высеивание на питательные среды и помещают посевы в термостат. Учет результатов проводят через 2 суток. (*C. Albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 5 дней).

Критерий эффективности – снижение общей микробной обсемененности кожи рук на 100%.

2) Методы оценки эффективности кожных антисептиков, предназначенных для обработки кожи операционного поля и локтевых сгибов доноров, изучение проводят в отношении естественной микрофлоры кожи; при искусственном обсеменении кожи тест-штаммом – *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*.

Для оценки эффективности антисептика в отношении естественной микрофлоры участок кожи внутренней поверхности предплечья размером 5×13 см последовательно протирают в одном направлении двумя стерильными марлевыми тампонами, смоченными антисептиком. Через определенное время марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором, с этого же участка кожи предплечья берут смыв, салфетку отбивают (встряхивают) в течение 10 минут в пробирке с бусами в нейтрализаторе или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают высеивание на питательные среды, которые помещают в термостат. Учет результатов проводят через 48 часов. Показатель эффективности – снижение общей микробной обсемененности кожи на 100%.

Для оценки эффективности антисептика при искусственной контаминации на участок кожи внутренней поверхности предплечья размером 5×13 см наносят 0,2 мл бульонной суточной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 10^5 КОЕ/мл, *C. albicans* - в концентрации 8×10^9 /мл, затем, после ее подсыхания, наносят 0,2 мл антисептика и растирают стерильным шпателем. Через определенное время марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором, берут смыв с кожи предплечья, отбивают его в течение 10 минут в пробирке с бусами в нейтрализаторе или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают высеивание на питательные среды, чашки с посевами инкубируют 48 часов при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (*C. Albicans* при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 72 часов). Показатель эффективности – отсутствие ростотест-культуры в смывах с кожи предплечья рук испытуемых.

3) Метод оценки эффективности кожных антисептиков, предназначенных для обработки кожи инъекционного поля.

Участок кожи внутренней поверхности предплечья размером 5×13 см (естественная микрофлора) протирают в одном направлении одним стерильным марлевым тампоном, смоченным антисептиком. Через определенное время с этого же участка кожи предплечья марлевой салфеткой, смоченной нейтрализатором, берут смыв, салфетку отбивают в течение 10 минут путем встряхивания в пробирке с бусами в нейтрализаторе или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают высевы на питательные среды, которые помещают в термостат. Учет результатов проводят через 48 часов. Показатель эффективности – снижение общей микробной обсемененности не менее, чем на 95%.

4) Метод определения пролонгированного (остаточного) антимикробного действия кожных антисептиков, предназначенных для обработки рук хирургов

Определение остаточного действия кожного антисептика (средства) на коже после обработки рук испытуемых в режиме применения, рекомендованном для обработки рук хирургов, проводят на естественно и искусственно обсемененной коже рук испытуемых.

После предварительного мытья рук испытуемых теплой проточной водой и туалетным мылом в течение двух минут, руки просушивают стерильной марлевой салфеткой. Затем на руки наносят испытуемое средство и проводят им обработку (обеззараживание) рук.

Испытуемые надевают на руки стерильные хирургические перчатки и выполняют в них обычную работу на протяжении трех часов.

Через каждый час испытуемые снимают перчатки, не выворачивая их. В каждую перчатку вливают по 10 мл стерильного раствора нейтрализатора или физиологического раствора, омывая внутренние поверхности перчаток этим раствором в течение 5 минут. После этого делают высеv смывной жидкости в количестве 0,5 мл на чашки Петри и заливают растопленным и остуженным до 40-45°C питательным агаром. Учет результатов производят через 48 часов инкубирования посевов в термостате при 37°C.

Для оценки эффективности пролонгированного (остаточного) антимикробного действия кожных антисептиков, предназначенных для обработки рук хирургов при искусственной контаминации проводят предварительное мытье рук испытуемых теплой проточной водой и туалетным мылом в течение двух минут, руки просушивают стерильной марлевой салфеткой. Затем на руки испытуемого наносят 0,2 мл бульонной суточной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 10⁵ КОЕ/мл, *C. albicans* - в концентрации 8×10⁹/мл. До обработки кожным антисептиком, с одной руки (контрольной) берут смыв и делают высеv на питательные среды. После этого наносят определенное количество изучаемого антисептика и проводят им обработку (обеззараживание) рук. Испытуемые надевают на руки стерильные хирургические перчатки и выполняют в них обычную работу на протяжении трех часов.

Через каждый час испытатели снимают перчатки, не выворачивая их. В каждую перчатку вливают по 10 мл стерильного раствора нейтрализатора или физиологического раствора, омывая внутренние поверхности перчаток этим раствором в течение 5 минут. После этого делают высеv смывной жидкости в количестве 0,5 мл на чашки Петри с питательной средой и растирают шпателем. Учет результатов производят через 48 часов инкубирования посевов в термостате при 37°C (*S. Albicans* при 30±1° до 5 дней).

Критерий эффективности – снижение общей микробной обсемененности кожи рук на 100%.

О наличии остаточного действия у изучаемого средства судят по количеству стерильных проб (отсутствие роста микроорганизмов), которое должно составлять более 50% от числа проб, отобранных у испытателей, обработавших руки средством.

5) Методы оценки эффективности кожных антисептиков, предназначенных для гигиенической обработки рук. Оценку эффективности обеззараживания кожным антисептиком проводят на руках испытателей при их искусственной контаминации тест-штаммом – *E. coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *S. albicans* а также в отношении естественной микрофлоры кожи.

Оценка эффективности кожных антисептиков в отношении искусственно контаминированной кожи. Для искусственной контаминации кожи используют суспензию 18-20 часовой бульонной культуры *E. coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, содержащей 10⁵ КОЕ/мл, *S. albicans* в концентрации 8×10⁹/мл. С этой целью 1 мл суспензии, содержащей 1×10⁵ КОЕ/мл испытуемого штамма, наносят на кисти рук и равномерно распределяют путем растирания. После подсыхания микробной взвеси с одной руки (контрольной) берут смыв и делают высеv на питательные среды. Затем обе руки обрабатывают кожным антисептиком, после чего с другой руки (опытной) также берут смыв. Смывы с кожи берут стерильными марлевыми салфетками размером 5×5 см, смоченными в стерильном растворе нейтрализатора. Марлеву ю салфетку после взятия смыва помещают в отдельную пробирку со стерильным физиологическим раствором и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 минут или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают посеvы на питательные среды по 0,1 мл смывных жидкостей из опытных и контрольных пробирок. Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 часов, (*S. Albicans* при 30±1°C до 5 дней).

после чего подсчитывают выросшие колонии. Показатель эффективности – снижение обсемененности кожи не менее, чем на 95%.

Оценка эффективности кожных антисептиков в отношении естественной микрофлоры кожи. С одной руки (контрольной) до обработки кожным антисептиком рут смыв. Затем обе руки обрабатывают кожным антисептиком, после чего с другой руки (опытной) также берут смыв. Смывы берут стерильными марлевыми салфетками размером 5×5 см, смоченными в стерильном растворе нейтрализатора. Марлеву ю салфетку после взятия смыва помещают в отдельную пробирку со стерильным физиологическим раствором и стеклянными бусами и встряхивают в течение 10 минут или тщательно

перемешивают на вортексе. Затем по 0,1 мл смывной жидкости из опытных и контрольных пробирок высевают на казеиновый агар (для учета общей микрофлоры), на среду Эндо (для учета грамотрицательных микроорганизмов), на желточно-солевой агар (для учета грамположительных микроорганизмов). Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 48 часов, после чего подсчитывают выросшие колонии. Показатель эффективности – снижение микробной обсемененности кожи не менее, чем на 95%.

б) Метод оценки эффективности антисептиков, предназначенных для санитарной обработки кожных покровов.

Оценка эффективности обеззараживающего действия дезинфицирующих средств для санитарной обработки кожных покровов проводится на открытых частях тела испытуемых (предплечья рук) в отношении искусственно нанесенной культуры тест-штамма – *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*.

На внутреннюю поверхность кожи предплечий рук размером 5×13 см наносят и равномерно растирают по 1 мл суспензии суточной бульонной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 2×10^5 кое/мл, *C. albicans* в концентрации 8×10^9 /мл. После подсыхания тест-культуры с кожи одного предплечья берут смыв (контроль) и делают высеив на плотные питательные среды. Затем предплечья обрабатывают кожным антисептиком по способу, рекомендованному для данного средства, после чего с кожи другого предплечья также берут смыв (опыт). Смывы с кожи берут стерильными марлевыми салфетками размером 5×5 см, смоченными в стерильном растворе нейтрализатора. Марлевые салфетки после взятия смывов помещают в отдельные пробирки со стерильным 0,9% раствором натрия хлорида и стеклянными бусами, которые встряхивают в течение 10 минут или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают посевы на среду Эндо по 0,1 мл смывных жидкостей из опытных и контрольных пробирок. Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 часов, (*C. Albicans* при 30±1°C до 5 дней) после чего подсчитывают выросшие колонии. Показатель эффективности – снижение обсемененности кожи не менее, чем на 99,99%.

7) Метод оценки эффективности кожных антисептиков – моющих средств в различных формах применения для гигиенической обработки рук, санитарной обработки кожных покровов

Оценку эффективности кожных антисептиков – моющих средств в различных формах применения проводят на руках испытуемых в отношении естественной и искусственно контаминированной микрофлорой кожи по снижению ее общей микробной обсемененности.

При естественной контаминации кожи рук - с одной руки (контрольной) до обработки кожным антисептиком берут смыв. Затем руки обрабатывают испытываемым антисептиком по способу, рекомендованному для применения данного средства, после чего с другой руки (опытной) также берется смыв. Смывы берут стерильными марлевыми салфетками размером 5×5 см, смоченными в стерильном растворе нейтрализатора. Марлевые салфетки после взятия смывов помещают в отдельные пробирки со стерильным физиологичес-

ким раствором и стеклянными бусами и встряхивают в течение 10 минут или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают посев смывной жидкости из опытных и контрольных пробирок на казеиновый агар (для учета общей микрофлоры), на среду Эндо (для учета грамтрицательных микроорганизмов), на желточно-солевой агар (для учета грамположительных микроорганизмов). Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 48 часов, после чего подсчитывают выросшие колонии. Показатель эффективности – снижение микробной обсемененности кожи не менее, чем на 60%.

Для искусственной контаминации кожи используют суспензию 18-20 часовой бульонной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 10⁵ КОЕ/мл, *C. albicans* в концентрации 8×10⁹/мл. На руки испытателя наносят 0,2 мл бульонной суточной культуры *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, содержащей 10⁵ КОЕ/мл, *C. albicans* - в концентрации 8×10⁹/мл. Затем, до обработки кожным антисептиком, с одной руки (контрольной) берут смыв и делают высеv на плотные питательные среды. Затем руки обрабатывают испытываемым антисептиком по способу, рекомендованному для применения данного средства, после чего с другой руки (опытной) также берется смыв. Смывы берут стерильными марлевыми салфетками размером 5×5 см, смоченными в стерильном растворе нейтрализатора. Марлевые салфетки после взятия смывов помещают в отдельные пробирки со стерильным физиологическим раствором и стеклянными бусами и встряхивают в течение 10 минут или тщательно перемешивают на вортексе. Затем делают посев смывной жидкости из опытных и контрольных пробирок на плотные питательные среды. Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 48 часов, (*C. Albicans* при 30±1°C до 5 дней) после чего подсчитывают выросшие колонии. Показатель эффективности – снижение микробной обсемененности кожи не менее, чем на 60%.

8) Метод оценки пролонгированного (остаточного) антимикробного действия кожных антисептиков, предназначенных для гигиенической обработки рук.

Остаточное действие кожных антисептиков оценивается на руках испытателей в отношении естественной микрофлоры кожи. Руки испытателей обрабатывают кожным антисептиком по способу, рекомендованному для применения данного средства. Затем с одной руки (контрольной) у каждого испытателя берут смыв стерильной марлевой салфеткой, смоченной стерильным раствором нейтрализатора, после чего испытатели выполняют работу на своем рабочем месте, но в течение всего эксперимента (от 30 минут до 3-х часов) не моют руки водой и туалетным мылом. Смывы с другой руки (опытной) берут стерильной марлевой салфеткой, смоченной в стерильном растворе нейтрализатора, через каждый час от начала эксперимента (в течение нескольких часов до 3 часов включительно), причем каждый раз смывы берут у разных испытателей. Марлевую салфетку после взятия смывов помещают в отдельную пробирку со стерильным 0,9% раствором натрия хлорида и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 минут или тщательно

перемешивают на вортексе. Затем производят посев смывной жидкости из опытных и контрольных пробирок на казеиновый агар для учета общей микрофлоры. Посевы инкубируют в термостате при 37°C в течение 48 часов, после чего подсчитывают выросшие колонии. Если кожный антисептик обладает пролонгированным действием, то на протяжении нескольких часов (1-3 часа) после обработки рук антисептиком количество микроорганизмов, обнаруживаемое в смывах, остается минимальным (единичные колонии).

49. Методы оценки эффективности средств стерилизации изделий медицинского назначения.

Оценку эффективности химических средств в виде растворов и газов проводят в экспериментах с тест-изделиями из различных материалов (детали и фрагменты из резин, пластмасс, металлов, стекла), искусственно контаминированных споровой формой тест-штаммов *B. cereus* (штамм устойчив к средствам на основе перекисных и хлорсодержащих соединений) и *B. subtilis* (резистентность к альдегидсодержащим средствам). С целью контаминации тест-изделий на них наносят взвесь тест-штамма микроорганизма (из расчета 10^5 - 10^6 микробных клеток на тест-изделие) и подсушивают. Обработку исследуемым средством осуществляют способом погружения в раствор (для жидких стерилизующих средств) или путем обработки в стерилизационной камере газового стерилизатора (для газообразных стерилизующих средств). Через определенные интервалы времени (в зависимости от состава средства) изделия извлекают из раствора ДС и подвергают исследованию на стерильность. При необходимости нейтрализации остатков стерилизующих средств на изделиях используют соответствующие (в зависимости от состава средства) нейтрализаторы. Стерильность изделий проверяют путем посева изделий (при использовании небольших по размеру изделий) или марлевых салфеток, которыми осуществляют отбор проб (при использовании крупных изделий), в питательные среды, регламентированные для контроля стерильности (тиогликолевая среда, сахарный бульон). Учет результатов проводят через 14 суток выдерживания посевов при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Средство считают эффективным при снижении обсемененности тест-изделий, контаминированных тест-штаммами микроорганизмов, на 100%.

50. Методы оценки эффективности средств предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения.

Моющие свойства оценивают по качеству удаления крови с тест-изделий. Изделия медицинского назначения из металлов, стекла, резин, пластмасс искусственно загрязняют донорской кровью, подсушивают, промывают проточной водой в течение 0,5 минут (при оценке эффективности средства для предстерилизационной очистки, совмещенной с дезинфекцией, данный этап не проводят) и погружают в исследуемый раствор средства. Через определенный промежуток времени (в зависимости от состава средства и его назначения) каждое изделие моют с помощью ерша, ватно-марлевого тампона или тканевой (марлевой) салфетки, каналы — с помощью шприца в течение 0,5 или 1,0 минут (в зависимости от обрабатываемого изделия и

состава средства) в том же растворе, в котором осуществляли замачивание, а затем промывают проточной питьевой водой. Качество очистки оценивают, проверяя наличие остатков крови на изделиях путем постановки азопирамовой пробы. В экспериментах используют не менее 10 изделий каждого вида. Средство считают эффективным при снижении числа тест-изделий, загрязненных кровью на 100%.

51. Исследование бактерицидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов, включая дезинфекцию высокого уровня (ДВУ).

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

На наружную поверхность тест-объекта наносят по 0,1 мл 1 млрд. суспензии тест-микробактерии, 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-микробактерии. Время обеззараживания эндоскопов, контаминированных *S.aureus* – не более 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-микробактерии. 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 10^6 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 18-22⁰С) в течение 20 мин.

Дезинфицирующий раствор готовят на стерильной 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.

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* – плюс 27⁰С 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.

54. Исследование и оценка спороцидной эффективности ДС, предназначенных для исследования эффективности ДВУ эндоскопов

Средства, предназначенные для ДВУ 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 из расчета 10^6 спор на каждый тест-объект. Контаминированные тест-объекты подсушивают при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 120 мин.

Обработку исследуемым средством осуществляют способом погружения в исследуемый раствор, имеющий температуру $18-20^\circ\text{C}$ (для альдегидсодержащих средств – $20-22^\circ\text{C}$). 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 $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 сутки. 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 $18-20^\circ\text{C}$, и не более 3 часов при умеренно повышенной температуре $50\pm 1^\circ\text{C}$.

Глава 4. Методы изучения и оценки вирулицидной активности дезинфицирующих средств.

52. Вирусы обладают различной 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, пикорновирусы, парвовирусы. Вирусы с липидсодержащей оболочкой, например, вирусы гриппа, герпеса 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. Для оценки вирулицидной активности следует использовать несколько тест-вирусов

(полиомиелита 1 типа и аденовирус 5 типа) с различной устойчивостью, что позволяет оценить активность ДС в отношении широкого спектра вирусов.

Результаты исследований вирулицидной активности ДС зависят также от характера используемого вирусодержащего материала, метода индикации вируса, метода определения вирулицидных свойств ДС, состава испытываемого ДС (ДВ и другие компоненты). Вирулицидная эффективность ДС наблюдения может продолжаться в течение 2-х месяцев и более.

53. 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.

54. 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 не токсичными 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. Нейтрализатор останавливает действие ДС. Его либо добавляют непосредственно в питательную среду, либо промывают им тест-объекты после воздействия (субстанции, исследуемого вещества) для того, чтобы остановить его действие на тест-вирус через заданное время (экспозицию).

55. Исследования на *invitro* в культуре клеток. В экспериментах используют культуру клеток, чувствительные к тест-вирусу. Критерии оценки вирулицидной активности ДС и субстанций. Вирулицидное ДС (субстанция) должно подавлять инфекционность обязательных для испытаний тест-вирусов исследуемых объектах не менее, чем на $4 \log_{10}$ ТЦИД₅₀ (то есть степень инактивации должна быть не менее 99,99%).

56. Степень инактивации тест-вируса определяют в чувствительных модельных системах по подавлению инфекционной, цитопатической активности вируса в культуре клеток. Для получения более точных результатов тест-вирус следует использовать с максимальным титром.

57. Изучение вирулицидной эффективности ДС суспензионным методом. К вирусной суспензии (ВС), в качестве которой может быть использована культуральная жидкость после удаления клеточных остатков добавляют испытываемое средство в объеме 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) в различных концентрациях.

58. Суспензионный тест проводят в двух вариантах: без белковой и с белковой нагрузкой. В последнем случае к вирусной суспензии добавляется инактивированная сыворотка крупного рогатого скота или фетальная сыворотка плода коровы из расчета 40% ее концентрации в смеси вирус-дезинфектант. Полученную смесь (как с сывороткой, так и без нее) нейтрализуют (в соотношении 1:1, т.е. 1 объем смеси и 1 объем нейтрализатора), встряхивая $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Время дезинфекционной выдержки согласно инструкции по

применению ДС изготовителя и используют для определения тест-вируса в чувствительной культуре клеток.

59. Методика определения инфекционного вируса после воздействия ДС (субстанции): исследуемый материал (смесь вируса, ДС и нейтрализатора) вносят пробирки с выращенным монослоем клеток или в суспензию клеток (в случае применения суспензионной культуры клеток), через 30-60 минут удаляют смесь, заменяют ее культуральной средой. Культуру клеток инкубируют в термостате при температуре, необходимой для репродукции вируса в течение срока наблюдения.

60. 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 минут.

61. Определение вирулицидной активности дезинфицирующих средств при обеззараживании воздуха в помещении (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 1×10^5 ТЦИД₅₀/м³. 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 Дрекслея наливают 5 мл раствора Хенкса или поддерживающей питательной среды с нейтрализатором и антибиотиками. Для контроля исходной контаминации воздуха вирусом перед экспериментом через склянки Дрекслея, 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 минут, в зависимости от предполагаемой эффективности ДС и учетом чувствительности вируса к ДВ, жидкость из двух склянок Дрекслея соединяют, перемешивают и по 2 мл вносят в пробирки с культурой клеток. 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. Во время эксперимента в камере должен постоянно работать вентилятор для перемещения 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, распада смеси 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.

62. Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании поверхностей. Определение вирулицидной активности ДС при обеззараживании тест-поверхностей проводят двумя способами: способом протирания (одно- или двукратного) или способом орошения.

1) В экспериментах используют тест-поверхности размером 10x10 см, гладкие, шероховатые, впитывающие и невпитывающие ДС из различных материалов: деревянные, оштукатуренные, окрашенные масляной или клеевой и других красками, оклеенные обоями, а также из линолеума, пластика, стекла, кафеля, метлахской плитки, фаянса, искусственной или натуральной кожи и др. Набор тест-поверхностей (далее «поверхностей») определяется назначением средства.

2) 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 вирусную суспензию из расчета-0,5 мл с добавлением 5% инактивированной сывороткой на площадь в 100 см², 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.

3) При обеззараживании контаминированных вирусной суспензией поверхностей некоторых видов- оштукатуренные, окрашенные клеевой и др. красками, оклеенные обоями, из стекла, фаянса, дерева, окрашенного масляной краской, из кафеля, их располагают вертикально и проводят обработку в этом положении (способом 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 м² обрабатываемой площади.

4) 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.

5) Пробы отбирают путем тщательного протирания орошенных раствором ДС поверхностей слегка увлажненной нейтрализатором в физиологическом растворе или Хенкса с антибиотиками стерильной марлевой салфеткой (5x5 см), а затем сухой. Салфетки помещают в широкогорлые пробирки с бусами с 5 мл нейтрализатора. Полученную смывную жидкость вносят в пробирки с культурой клеток или вводят в организм лабораторного

животного. Оптимальное время обеззараживания поверхностей согласно инструкции по применению ДС изготовителя.

Глава 5. Методы определения токсикологических показателей безопасности дезинфицирующих, стерилизующих средств.

5.1 Общие требования к организации и проведению токсикологических исследований дезинфекционных средств.

63. Для проведения испытаний дезинфекционных средств разработаны токсикологические показатели безопасности, в основу которых положены лимитирующие критерии вредности при потенциально опасных путях поступления в организм. При этом в связи с разным назначением дезинфекционных средств, с различными видами их препаративных форм и условиями применения предложены дифференцированные лимитирующие критерии для средств дезинфекции, кожных антисептиков, химических средств для стерилизации и предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения. В зависимости от величины нормативных показателей дезсредств регламентируются условия и сфера их применения.

64. Установление лимитирующих критериев для дезсредств предполагает использование методов по определению их основных параметров токсичности и опасности, а также проявлений общетоксических и специфических свойств в соответствии с назначением и режимом применения

65. Для оценки безопасности дезинфекционных средств и разработки гигиенических рекомендаций по их применению необходимы, прежде всего, следующие сведения:

- состав средства, структурная формула действующего вещества (субстанции) и его физико-химические свойства; молекулярная масса; плотность, летучесть, температура кипения или плавления, стойкость в естественных условиях, растворимость в воде и жирах и др.,

- степень чистоты. При наличии примесей в сырье необходимо знать их состав и количественное содержание;

- характеристика вспомогательных компонентов рецептуры;

- назначение средства;

- нормы расхода и рабочие концентрации, способы и кратность обработки соответствующих объектов;

66. Исходными данными для организации токсикологического изучения дезинфекционных средств должны служить литературные материалы о токсичности и опасности входящих в их состав активно действующих веществ.

67. Токсикологическая характеристика действующих веществ (далее - ДВ или субстанций) должна включать сведения по следующим параметрам токсикометрии при потенциально опасных путях поступления в организм и по оценке общетоксических, специфических и отдаленных эффектов:

- острая токсичность (ЛД₅₀) при введении в желудок;

- острая токсичность (ЛД₅₀) при нанесении на кожу;

- острая токсичность (ЛС₅₀ и порог острого действия) при ингаляционном воздействии в насыщающих концентрациях паров;

- клиническая картина отравления;
- подострая токсичность (кумулятивные свойства);
- хроническая токсичность;
- сенсибилизирующее действие;
- местно-раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз;
- мутагенный эффект;
- эмбриотропное действие;
- тератогенное действие;
- гонадотропное действие и репродуктивная функция;
- онкогенность;
- метаболизм в организме млекопитающих.

68. Кроме того необходимы сведения о гигиеническом нормировании соответствующих веществ:

- гигиенические нормативы – ПДК или ОБУВ в воздухе рабочей зоны, обеспечивающие безопасность работающих при производстве дезинфекционных субстанций или соответствующих ДС в Казахстане;
- гигиенические нормативы – ПДК (максимально разовые и средне-суточные) или ОБУВ (максимально разовые) в атмосферном воздухе для субстанций ДС, обеспечивающие безопасность в окружающей среде.

69. Целью токсикологических исследований является определение характера и степени воздействия химических средств, в том числе и дезсредств, на биологические системы организма, в основном, теплокровных животных, и получение данных о зависимости «эффект-норма расхода» для данного средства. Наличие таких данных позволяет без существенного снижения эффективности того или иного препарата свести опасность для людей при его использовании до минимума. Выбор наиболее информативных методов оценки токсичности дезсредств с точным соблюдением разработанной схемы проведения эксперимента имеет первостепенное значение в решении данной задачи. Условия эксперимента определяются назначением, составом, формой и сферой применения препарата.

70. Методы оценки токсичности разных по назначению дезсредств при выборе сходных параметров оценки безопасности являются однотипными. Каждый из них требует использования группы здоровых животных, содержащихся при соответствующих условиях с воздействием на них градуированных доз исследуемого средства. Для этих целей, как правило, используются основные виды лабораторных животных – крысы, мыши, морские свинки и кролики. Исследования выполняются на опытных и контрольных группах животных.

71. При испытании средства необходимо тщательно следить за проявлением симптомов интоксикации. По завершении исследования все животные, в том числе и контрольные, подлежат патоморфологическим исследованиям.

72. Выбор животных для токсикологических экспериментов предполагает максимальное сходство моделируемого на них процесса с интоксикацией у человека. Чтобы с большей степенью достоверности

экстраполировать на человека данные, полученные в эксперименте на животных, исследования желательнее проводить на нескольких видах половозрелых животных обоего пола (обязательным видом являются крысы) в статистически достаточных группах в зависимости от цели эксперимента (но не менее 5-6 особей для мелких лабораторных животных и не менее 3 – для крупных: морские свинки, кролики, кошки). При отборе животных в эксперимент должен соблюдаться метод случайной выборки. Подопытные животные должны быть одной линии, вида, возраста, пола, весовых характеристик (масса мышей 18-22 г, крыс – 180-200 г, морских свинок – 200-300 г, кроликов 2-3 кг). Максимальная разница в весе тела животных не должна составлять более 10%. Животные должны быть здоровыми, что определяется наблюдением в условиях карантина. Срок наблюдения за животными после острого воздействия – 7 дней, после подострого и хронического – месяц.

Перед экспериментом необходимо снять фоновые данные по основным показателям (нервная система, масса тела, кровь) и отбраковать нестандартных животных. Пищевой рацион должен содержать все необходимые компоненты для нормальной жизнедеятельности животных.

В виварии необходимо контролировать уровень аммиака, температуру и влажность воздуха. Концентрация аммиака не должна превышать 0,2 мг/м³. В выборе показателей (физиологических, биохимических и морфологических) следует исходить из направленности действия средств.

73. Результаты всех токсикологических экспериментов должны быть подвергнуты статистической обработке общепринятыми методами (критерии Стьюдента или Фишера, непараметрические критерии и др.). В первую очередь принимаются изменения наиболее чувствительного вида животных. В трактовке степени вредности препаратов, выявленные изменения учитываются в случае их выхода за рамки колебаний, соответствующих физиологической норме реакции (в 1,5-26 раз в зависимости от вида используемых показателей).

5.2 Методы изучения токсичности и опасности микробицидных (дезинфицирующих) средств.

74. Различные дезинфицирующие средства по своему назначению могут иметь широкую сферу применения: в лечебно-профилактических, детских учреждениях, на объектах коммунального хозяйства, на предприятиях общественного питания, в очагах инфекционных заболеваний, населением в быту, на предприятиях пищевой промышленности (пивобезалкогольной и винодельческой, мясомолочной, рыбоперерабатывающей, хлебопекарной и кондитерской), для обеззараживания транспортных средств (санитарного транспорта, перевозки пищевых продуктов), воды в плавательных бассейнах, а также питьевой воды при нецентрализованном водоснабжении.

75. Программа изучения токсичности и опасности дезинфицирующих средств определяется конкретным его назначением, составом, видом и свойствами действующих веществ, режимами применения (нормой расхода,

рабочими концентрациями, способами обработки) и видами обрабатываемых объектов.

5.3 Перечень необходимых показателей токсичности и опасности дезинфицирующих средств.

76. Перечень определяемых и оцениваемых показателей токсичности и опасности дезинфицирующих средств, предназначенные для медицинской дезинфекции в лечебно-профилактических учреждениях - изделий медицинского назначения, поверхностей, посуды, белья, игрушек, санитарно-технического оборудования, предметов ухода за больными, а также для дезинфекции поверхностей в коммунальном хозяйстве, технологического оборудования и тары на предприятиях пищевой промышленности и т.п.

77. Литературные данные по токсикологической характеристике ДВ, а также всех других компонентов состава дезинфицирующего средства, включая вспомогательные: наполнители, стабилизаторы, антикоррозионные добавки, отдушки, красители и т.д.

78. Экспериментальные данные:

- Параметры острой токсичности дезинфицирующего средства (ЛД₅₀):
при введении в желудок.
при нанесении на кожу.
при внутрибрюшинном введении.

- Оценка острой ингаляционной опасности дезинфицирующего средства и его рабочих растворов в насыщающих концентрациях паров.

- Оценка местно-раздражающего действия на кожу самого дезинфицирующего средства и его рабочих растворов при однократном, а рабочих растворов дезинфицирующего средства также и при многократном нанесении на кожу.

- Оценка местно-раздражающего действия на глаза самого дезинфицирующего средства и его рабочих растворов при однократном нанесении.

- Оценка кожно-резорбтивного действия рабочих растворов дезинфицирующего средства.

- Кумулятивный эффект дезинфицирующего средства экспресс методом (метод Лима).

- Оценка сенсibiliзирующего действия ДС (комплексом методов).

- Экспериментальные данные ингаляционной опасности рабочих растворов ДС в режимах применения: орошение, протирание. Определение порогов острого и подострого токсического действия при разных способах обработки поверхностей с расчетом зоны биоцидного действия. Оценка безопасности применения по классификации степени ингаляционной опасности дезинфицирующих средств.

79. Комплексная токсикологическая характеристика дезинфицирующего средства, разработка мер предосторожности при работе и хранении, первая

помощь при отравлении для включения соответствующих требований в Инструкцию по применению и в текст этикетки.

5.4. Методы определения и оценки токсичности и опасности дезинфицирующих средств.

80. Определение параметров острой токсичности.

1) Острая токсичность ДС определяется как вредное действие, проявляющееся в течение короткого периода после однократного введения дозы или многократных доз, вводимых в течение суток. Исследование острой токсичности дезсредств направлено на установление параметров острой токсичности и проявлений общетоксических и специфических эффектов, а также на установление существующих видовых различий.

2) К параметрам острой токсичности дезсредств относится: определение средней смертельной дозы (LD_{50}) при введении в желудок, при нанесении на кожу и при введении в брюшную полость, а также определение LC_{50} (среднесмертельная концентрация) в насыщающих концентрациях паров при ингаляции.

5.4.1. Определение и оценка средне-смертельной дозы (LD_{50}) при введении в желудок.

81. Определение LD_{50} при введении в желудок.

Для изучаемого средства желательное определение LD_{50} на двух видах животных (крысы и/или мыши). Выбирается 4-5 доз в геометрической прогрессии с шагом в два раза. Максимальная доза – 5 г/кг. Препараты через зонд натошак вводятся в желудок в чистом виде, в водных и масляных растворах, в индифферентном растворителе, в виде эмульсий или суспензий в крахмале. Максимально вводимый объем в желудок для мышей не должен превышать 0,5-1 мл, для крыс – 5 мл. Кормление животных возобновляется через 3 часа после введения препарата. У животных регистрируют клиническую картину отравления сразу после введения, а затем в течение 7 суток, при вскрытии описывают макроскопические изменения в органах. Расчет указанного параметра проводится статистическими методами, принятыми для обработки экспериментально-токсикологических исследований. Полученные величины LD_{50} при введении в желудок дезинфекционных средств классифицируются по 4 классам опасности в соответствии ГОСТ 12.1.007-76 (Таблица 3).

При необходимости проводится гистопатологическое исследование органов.

При условии экспертной оценки известных соединений или композиций допускается определение LD_{50} ускоренным методом “одной точки” по Ван Дер Вардену.

Таблица 3. Классификация токсичности и опасности вредных химических веществ (ГОСТ 12.1.007-76)

Наименование показателя	Класс опасности			
	1 Чрезвычайно опасные	2 Высокоопасн ые	3 Умеренно опасные	4 Малоопасные
Предельно допустимая концентрация (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	менее 0,1	0,1 - 1,0	1,1 - 10,0	более 10,0
Среднесмертельная доза (ЛД ₅₀) при введении в желудок, мг/кг	менее 15	15 - 150	151 - 5000	более 5000
Среднесмертельная доза (ЛД ₅₀) при нанесении на кожу, мг/кг	менее 100	100 - 500	501 - 2500	более 2500

5.4.2. Определение и оценка средне-смертельной дозы (ЛД₅₀) при нанесении на неповрежденную кожу.

82. Определение средней смертельной дозы при нанесении на неповрежденную кожу (LD₅₀ накожная) проводят на белых крысах или белых мышах обоего пола путем однократного нанесения средства на кожу спины после предварительного удаления волосяного покрова (без использования депиляторных средств) за сутки до опыта. Средства наносят в чистом виде или в разведении в 4-5 дозах, при этом принимают меры, исключающие слизывание препарата и его поступление в организм через органы дыхания. Площадь экспериментального участка кожи на спине крыс 4×4 см, мышей – 2×2 см, экспозиция – 4 часа. У животных регистрируют клинические проявления интоксикации и сроки гибели, при вскрытии описывают макроскопические изменения в органах. Наблюдение за гибелью животных (%) проводят в течение двух недель. Опасность средства оценивается в соответствии с «Классификацией токсичности и опасности вредных химических веществ» (Таблица 3).

5.4.3 Определение и оценка средне-смертельной дозы при введении в брюшную полость.

83. Определение средней смертельной дозы (LD₅₀) при введении в брюшную полость проводят для средств дезинфекции, стерилизации и предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения, контактирующих с внутренней средой организма. Исследования проводятся на мышах или крысах, используя 4-5 доз (в геометрической прогрессии).

Максимальный объем для мышей составляет 0,5 мл, а для крыс – 1-1,5 мл. Срок наблюдения за животными составляет 2 недели. После введения у животных описывают клиническую картину интоксикации и регистрируют гибель при наблюдении. Расчет указанного параметра проводится статистическими методами. Полученные результаты оценивают по классификации токсичности веществ при введении под кожу и в брюшную полость животного (по К.К.Сидорову) (Таблица 4.)

Таблица 4. Классификация токсичности веществ при введении под кожу и в брюшную полость животного (по К.К.Сидорову)

Класс токсичности	Степень токсичности	Средняя смертельная доза (мг/кг) при введении:	
		под кожу	в брюшную полость
1	Чрезвычайно Токсично	≤ 0,3	≤ 0,2
2	Высоко токсично	0,4 - 15	0,3 - 10,0
3	Умеренно токсично	16 - 150	11 – 100
4	Мало токсично	151 - 1500	101 – 1000
5	Практически Нетоксично	1501 - 4500	1001 – 3000
6	Относительно Безвредно	>4500	>3000

5.4.4. Определение и оценка ингаляционная опасность дезинфицирующих средств по степени их летучести.

84. Определение ингаляционной опасности дезсредств в насыщающих концентрациях их паров по степени летучести проводят в герметичных емкостях (эксикаторы, камеры, бутылки). Объем воздуха создают из расчета 9 дм³ на 2 часа на каждую мышь. Для ориентировки каждая концентрация испытывается на 4 мышах (желательно 2 самца, 2 самки; в одну и ту же бутылку следует помещать обоего пола). Отравление проводится однократно в течении 2 часов. Опыты проводятся при комнатной температуре, которые обязательно регистрируются, в виду возможной зависимости действия вещества от окружающей температуры. Для создания концентрации, по расчету равной CL₅₀, следует рассчитать объемное количество вещества, достаточное для получения желаемой концентрации из следующего уравнения:

$$\text{Кол-во вещества в см}^3 = \frac{\text{концентрация в мг/дм}^3 * \text{емкость сосуда в л}}{\text{удельный вес вещества} * 1000}$$

85. Опасность ингаляционного отравления дезинфицирующим средством характеризуется степенью проявления интоксикации и оценивается по соответствующей классификации химических веществ (Таблица 5.)

Таблица 5. Классификация химических веществ по степени летучести (C₂₀)

Класс опасности	Степень опасности и выраженность действия
1 - Чрезвычайно опасное вещество	насыщающая концентрация вызывает гибель
2 - Высоко опасное	насыщающая концентрация вызывает отчетливые проявления интоксикации, гибель отсутствует
3 - Умеренно опасное	насыщающая концентрация вызывает минимальные изменения интегральных показателей при обследовании животных (пороговый уровень)
4 - Малоопасное	насыщающая концентрация не оказывает токсического действия

Летучее вещество следует вносить в сосуд когда мыши уже находятся в ней, то для избежания попадания жидкости непосредственно на кожу животного, отмеренное количество выливается из пипетки на бумажный фильтр, висячий на нитках ниже горловины сосуда.

Если по ходу исследований требуется создать насыщающую воздух концентрацию, то вещество наливается в плоскую накрытую твердой сеткой посуду заведомо в избытке и оставляется в эксикаторе или камере на 4 часа; после этого в эксикатор или камеру быстро помещают мышей, соблюдая осторожность во избежание значительного снижения созданной концентрации.

После окончания первой экспозиции надо осмотреть бумажный фильтр. Если он влажный или жирный, это показывает, что полного испарения вещества не произошло. Следовательно, концентрация его паров в сосуде была меньше рассчитанной. В таком случае перед следующей экспозицией нужно взвесить новый бумажный фильтр. Сразу же после окончания второй экспозиции фильтр взвешивается вторично. Разность между конечным и исходным весом фильтра следует вычесть из навески вещества и рассчитать концентрацию с учетом остатка на фильтре.

Если при выбранной концентрации все животные остались живы, или напротив, за сутки все погибли, опыт проводится с концентрацией,

соответственно увеличенной или уменьшенной в 2 раза. В том случае, когда при некоторой концентрации все животные выжили, а при удвоенной — все погибли, дальнейшее определение CL_{50} производится в границах, обозначенных этими концентрациями. Эти предварительные опыты выявляют: частично смертельную, концентрацию (вызывающую гибель одной — трех мышей из четырех).

По ходу затравок регистрируются проявления возбуждения (двигательная активность), раздражающего действия, вялости, атаксии, наступление «бокового положения», исчезновение реакции животных на постукивание по бутылки, судороги, появление цианоза или гиперемии и т.д.

Наблюдение за животными ведется в течение 7 суток. Учитывается время гибели или восстановления нормального состояния. Животные взвешиваются перед затравкой, а затем ежедневно. Выживших животных на восьмой день убивают декапитацией.

Всех животных вскрывают, видимые изменения внутренних органов регистрируют. Для расчета CL_{50} , исходя из экспериментальных данных, удобно применять метод Кербера. Полученные величины CL_{50} дезинфекционных средств классифицируются по 4 классам опасности в соответствии ГОСТ 12.1.007-76.

В острых опытах исследование испытуемого вещества проводится однократно, а в подострых — ежедневно по 5 раз в неделю на протяжении всего эксперимента (от 2-4 недель).

5.4.5. Определение кумулятивных свойств.

86. Под кумуляцией понимается усиление проявления действия яда при его повторном воздействии.

Выраженность кумулятивных свойств средств оценивается на основании коэффициента кумуляции: отношение величины суммарной дозы яда, вызывающей определенный эффект (чаще смертельный у 50% подопытных животных) при многократном дробном введении, к величине дозы, вызывающей эффект при однократном воздействии.

Изучение кумулятивных свойств дезинфекционных средств проводится ускоренным методом Лима в течение 24 ± 4 дней при введении в желудок крыс и мышей. Начальная доза составляет $0,1 LD_{50}$ и вводится 4 дня, затем дозу каждый раз увеличивают в 1,5 раза до окончания опыта. В течение всего эксперимента регистрируется гибель животных. В конце рассчитывается средне-летальная доза для повторного воздействия (LD_{50}^n):

$$K_{\text{кум.}} = \frac{LD_{50}^n}{LD_{50}^1}$$

Если $K_{\text{кум.}} < 1$, это указывает на кумулятивные свойства средства, а если $K_{\text{кум.}} > 1$, это свидетельствует о повышении резистентности организма к этому соединению.

Согласно классификации различают 4 класса кумулятивного эффекта:

- 1 класс (сверхкумуляция) - $K_{\text{кум.}}$ менее 1;
- 2 класс (выраженная кумуляция) - $K_{\text{кум.}}$ от 1 до 3;
- 3 класс (умеренная кумуляция) - $K_{\text{кум.}}$ от 3,1 до 5;
- 4 класс (слабая кумуляция) - $K_{\text{кум.}}$ более 5.

5.4.6. Определение и оценка местно-раздражающего действия на кожу.

87. Определение местно-раздражающего действия на неповрежденные кожные проводится при однократной аппликации, а кожных антисептиков – при повторных (10-кратных) аппликациях на кожные покровы. Используются животные 2-х видов (морские свинки, кролики). Животные отбираются в эксперимент со светлой неповрежденной кожей. Предварительно (за сутки) кожу освобождают от волосяного покрова. Средства наносят открытым способом плотностью 15-20 мг/см². Площадь участка аппликации кролика 8×9 см, морской свинки 4×5 см. Экспозиция контакта дезинфицирующих средств, кожных антисептиков с кожей – 4 часа с последующим удалением остатков. Изменения кожи регистрируют ежедневно и до окончания воздействия – по оценке эритемы и отека кожи. Выраженность раздражающего действия оценивается по «Классификации опасности по выраженности местно-раздражающих свойств дезинфицирующих средств на кожу» (Таблица 6).

Таблица 6. Классификация опасности по выраженности местно-раздражающих свойств дезинфицирующих средств на коже.

Выраженность раздражающего действия	Средний суммарный балл выраженности эритемы и величины отека	Классы опасности
Резко выраженное	более 6	1
Выраженное	4,1 - 6,0	2
Умеренное	2,1 - 4,0	3
Слабое или отсутствие	0 - 2,0	4

88. Классификации интенсивности эритемы и отека кожи (Таблицы 7, 8.) При изучении местно-раздражающего действия на кожу кожных антисептиков в режиме применения (10 аппликаций) эффект должен отсутствовать.

Таблица 7. Оценка интенсивности местно-раздражающего действия химических веществ на кожу.

Оценка степени эритемы

Интенсивность эритемы (визуально)	Оценка эритемы по линейке С.В.Суворова, баллы
Отсутствие эритемы	0
Слабая (розовый тон)	1
Умеренно выраженная (розовокрасный тон)	2
Выраженная (красный тон)	3
Резко выраженная (ярко красный тон)	4

Таблица 8. Оценка интенсивности отека кожи.

Степень интенсивности отека	Увеличение толщины кожной складки, мм		Оценка отека баллы
	кролики	морские свинки	
Отсутствие	0	0	0
Слабая	до 0,5	до 0,3	1
Умеренная	0,6 - 1,0	0,4 - 0,6	2
Выраженная	1,1 - 2,0	0,7 - 1,0	3
Резко выраженная	более 2,0	более 1,0	4

Состояние кожи регистрируется визуально ежедневно в течение 14 дней. Отмечают функционально-морфологические нарушения кожи (эритема, отек, трещины, некроз, шелушение, сухость, изъязвления). Баллы по эритеме и отеку суммируются для каждого подопытного животного, после чего вычисляется средний суммарный балл для данной группы экспериментальных животных. (Таблица 6)

5.4.7. Определение и оценка местно-раздражающего действия на глаза.

89. Местно-раздражающее действие на глаза средства оценивается не менее чем на 3 кроликах или морских свинках при закапывании в конъюнктивальный свод правого глаза при однократном внесении нативного вещества в количестве 50-100 мкл (для жидких) и 50-100 мкг (порошок), левый глаз при этом служит в качестве контрольного (закапывается 1-2 капли дистиллированной воды). Визуальное наблюдение за состоянием слизистой и конъюнктивы глаз подопытных животных проводится на протяжении 24 часов при отсутствии раздражения и инстиляции вытяжек (через 1 и 24 часа после воздействия), и в течении двух недель для веществ обладающих выраженным раздражающим действием. Изучение влияния аэрозольного состава на слизистую оболочку глаза проводят однократно. С расстояния 20 см, глаз кролика орошают из аэрозольного баллона в течение 1 секунды. Другой глаз является контролем.

Отмечают выраженность гиперемии и отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза (Таблица 9) в соответствии с «Классификацией опасности по выраженности раздражающих свойств ДС на глаза» (Таблица 10).

Таблица 9. Оценка интенсивности местно-раздражающего действия средства на глаза.

1	2	3
А	Покраснение (века) и бульбарная конъюнктивит (не затрагивающая роговицу и радужную оболочку)	Оценка, баллы
	Состояние сосудов нормальное	0
	Сосуды явно расширены больше нормы	1
	Разлитая гиперемия, отдельные сосуды трудноразличимы	2
	Диффузная, ярко красного цвета гиперемия	3
Б	Отек век	
	Отека нет	0
	Слабый отек (включая мигательную перепонку)	1
	Явный отек и частичное выворачивание века	2
	Отек, веки наполовину закрылись	3
	Отек, веки закрыты более, чем наполовину, или полностью закрылись	4
В	Выделения	
	Выделений нет	0
	Минимальное количество в углу глазной щели	1
	Количество выделений с увлажнением век и шерсти, прилегающей к векам	2
	Количество выделений с увлажнением век и шерсти и значительной площади вокруг глаз	3
Сумма баллов (А + Б + В)		
Роговица		
А	Помутнение - степень плотности (участок наибольшей плотности)	Оценка, баллы
	Помутнения нет	0
	Рассеянное или диффузное, детали радужной оболочки хорошо видны	1
	Хорошо различимые полупрозрачные участки, детали радужной оболочки слегка замутнены.	2
	Участок с замутнением, детали радужной оболочки не видны, размер зрачка едва различим	3
	Непрозрачная, радужная оболочка не видна	4
Б	Площадь поражения роговицы	
	Одна четверть (или менее), но более нуля	1
	Более одной четверти, но менее половины	2
	Более половины, но менее трех четвертей	3
	Более трех четвертей, но менее всей площади	4
Сумма баллов (А + Б)		

90. Результаты обследования в группе животных суммируются и выносятся заключение о степени и характере поражения глаз при действии на

него испытуемого средства. Указывается характер конъюнктивита (поверхностный, глубокий), наличие кератита. Раздражающее действие оценивается на основе классификации выраженности раздражающих свойств дезинфицирующих средств на глаза Таблица 9.

Таблица 10. Классификация опасности по выраженности раздражающих свойств дезинфицирующих средств на глаза.

Выраженность раздражающего действия	Средний суммарный балл (конъюнктивита (А+Б+В) + роговица (А+Б))	Классы опасности
Резко выраженное	более 11	1
Выраженное	7 - 10	2
Умеренное	4 - 6	3
Слабое	1 - 3	4
Отсутствие	0	5

5.4.8. Определение и оценка кожно-резорбтивного действия.

91. Оценка кожно-резорбтивного действия проводится при отсутствии местно-раздражающего эффекта проводят изучение кожно-резорбтивного действия на мышах или крысах методом погружения хвостов в изучаемый раствор. Опыты проводятся на 6 мышах, которые помещают в специальные домики, Хвосты животных погружают на 2/3 длины в испытуемую жидкость, длительность воздействия от 2 до 4 ч (в зависимости от вида животных - соответственно мыши и крысы) затем средство смывают. Продолжительность наблюдения на протяжении от 7 до 14 дней учитываются сроки гибели животных, вес пеживших отравления животных, их общее состояние и местная реакция.

Результаты опыта оцениваются с одной стороны, по опасности проникания вещества через кожу, с другой - по характеру его местного действия. Различают 5 разрядов по опасности возникновения острых отравлений при действиях на кожу (Таблица 11).

Таблица 11. Разряды по опасности возникновения острых отравлений при действиях на кожу.

Результаты опытов	Разряд по убывающей степени токсичности
Гибель всех животных в опыте или после него	1
Гибель одного или части животных после опыта	2
Животные живы, имеются не обратимые изменения кожи хвоста у всех или части мышей	3
Животные живы, изменения кожи хвоста обратимые у всех животных	4
Животные живы, кожа не изменена	5

92. Исследования кожно-резорбтивного действия средства в аэрозольных баллонах проводят при однократном воздействии. Животных фиксируют в станке спиной кверху, закрывают их листом из оргстекла или картона с вырезанным в центре окном соответствующей площади по размеру и форме аналогичного подопытному участку кожи. Затем смесь из баллонов равномерно распыляют по всей поверхности картона (в том числе и коже животного). За животными наблюдают в течение 14 суток. При необходимости проводится обследование животных по интегральным и специфическим показателям в зависимости от механизма действия средства.

5.4.9. Определение и оценка сенсibiliзирующих свойств.

93. Сенсibiliзация осуществляется на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. В опытную и контрольную группу берут по 10-12 беспородных белых мышей. Животных сенсibiliзируют 10 мМоль или 100 микролитр (далее – мкл) изучаемого вещества однократно внутрикожно в основание хвоста туберкулиновым или микрошприцом. Нативное вещество растворяют в растворе Хенкса (рН 7,5) или стерильном физиологическом растворе, таким образом чтобы сенсibiliзирующая доза на одного животного содержалась в 30 мкл (целесообразно использовать 0,35% рабочую концентрацию). Для водонерастворимых веществ в качестве растворителей используют диметилсульфоксид, этиловый спирт, ацетон в конечной концентрации не более 20%, а также автоклавированные вазелиновые или растительные масла. Из рабочей концентрации вещества готовятся в соотношении 1:1 смесь с иммуностимулятором-полным адьювантом Фрейнда (ПАВ) при тщательном совместном эмульгировании (интенсивном перемешивании на магнитной мешалке). Опытным животным вводится по 60 мкл сенсibiliзирующей дозы в ПАФ, контрольным – 60 мкл смеси ПАВ с растворителем (без изучаемого вещества).

Выявление сенсibiliзации проводят на 6 сутки опыта провокационными пробами по тесту опухания лапки мыши (ТОЛМ) и/или тесту опухания уха (ТОУМ).

Методические приемы выявления сенсibiliзирующей способности вещества.

Тест опухания лапы мыши.

94. В подушечку задней лапы (под апоневроз) контрольных и опытных животных вводят разрешающую дозу изучаемого вещества (100-150 мкг). При этом целесообразно для тестирования применять рабочие концентрации вещества, используемые для сенсibiliзации, в объеме 40 мкл. Вытяжки из изделий вводят в объеме 100 мкл. О величине отека (показатель ТОЛМ), т.е. о развитии ГЗТ, судят по разнице в толщине лапы, измеряемой до и через 24 часа после перкутанного тестирования инженерным микрометром в мм. У контрольных животных показатель ТОЛМ, как правило, не должен превышать

10. Для исключения неспецифического токсико-раздражающего эффекта (для веществ 3-5 классов раздражающего действия обязательно) разрешающую дозу вещества предварительно испытывают на 3-х интактных животных. При установлении запредельного неспецифического эффекта концентрацию вещества снижают при увеличении вводимого объема (до 50-100 мкл). Сравнивают средние групповые показатели ТОЛМ опытных и контрольных животных в абсолютных (мм) и относительных (балл) единицах. Оценку ТОЛМ в баллах проводят по следующей шкале: 0 баллов - ТОЛМ до 0,1 мм; 1 балл - 0,11-0,20 мм; 2 балла - 0,21-0,30 мм; 3 балла - 0,31-0,40 мм; 4 балла - 0,41-0,50 мм; 5 баллов - 0,51 мм и более.

Тест опухания уха мыши.

95. Разрешающую дозу вещества в оптимальной концентрации наносят пипеточным дозатором по 25 мкл на кожу обеих сторон уха, фиксированного у основания глазным пинцетом. Показатель ТОУМ определяют по разнице в толщине уха, измеряемой микрометром до и через 24 часа после эпикутанного тестирования. Оптимальная концентрация вещества не должна вызывать неспецифического раздражения кожи (абс. показатель ТОУМ не более 3 мкм) и предварительно подбирается на 3-х интактных мышах. Чаще всего применяются для эпикутанного тестирования 0,1-10% концентрации, а 37 в качестве растворителей используют ацетон, 70% спирт, диметилсульфоксид, петролейный эфир. Оценивают ГЗТ по абсолютному (мкм) и относительному (балл) показателю ТОУМ по специальной шкале. Относительный показатель ТОУМ (балл) соответствует величине отека уха (мкм): 0 баллов - 1-2 мкм, 1 балл - 3-7 мкм, 2 балла - 8-12 мкм, 3 балла - 13-17 мкм, 4 балла - 18-22 мкм, 5 баллов - 23 и более мкм и/или наличие геморрагий, некроза.

5.5. Оценка безопасности остаточных количеств дезинфицирующих средств на изделиях медицинского назначения.

96. Оценку безопасности остаточных количеств дезинфицирующего средства на ИМН после дезинфекции, предстерилизационной очистки и стерилизации химическим способом проводят при изучении отмыва ИМН под проточной водой или при погружении изделий в разные емкости с водой. Экстракцию остаточных количеств средства с ИМН проводят в термостате при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ дистиллированной водой или физиологическим раствором в зависимости от химического состава дезинфицирующего средства, вида ИМН и материалов, из которых они изготовлены (металл, стекло, резина, пластмассы и полимеры).

Безопасность экстрактов оценивают по одному из указанных ниже методов:

1) По пирогенной реакции на кроликах, которых готовят в соответствии с требованиями методики, указанной в ГФ РК статья «Пирогенность». Стерильные подогретые до $36 \pm 1^\circ\text{C}$ экстракты на физиологическом растворе вводят внутривенно стерильным шприцем. Измерение ректальной температуры проводят с интервалами в 1 час.

Непирогенным считают экстракт, если сумма повышения температуры у 3-х кроликов меньше или равна $1,4^{\circ}\text{C}$.

2) На культуре клеток 4647, неконтаминированной посторонней микрофлорой. Используют диплоидную культуру клеток человека (далее - ДКЧ) – из кожно-мышечного лоскута эмбриональной ткани человека. Для культивирования ДКЧ в матрасах и для культивирования клеток в пробирках используется среда Игла. Культура ДКЧ должна быть со сформировавшимся монослоем и без деструктивных изменений, с различимыми границами клеток и иметь типичную фибробластоподобную морфологию. Показатель безопасности – отсутствие цитотоксического действия (далее - ЦТД) и морфологических изменений в клетках (не более 10 в поле зрения).

5.5.1. Критерии отбора дезинфицирующих средств, предназначенных для медицинских организаций (далее- МО).

97. Острое ингаляционное действие ДС (аэрозоли и/или пары) оценивают по зоне острого токсического действия.

При зоне острого токсического действия менее 1, дезсредство следует отнести к 1 классу высоко опасных средств и использовать только в экстремальных чрезвычайных эпидемиологических ситуациях обученному персоналу с применением жестких средств индивидуальной защиты (противогаз, противочумный костюм).

При зоне острого токсического действия, равной от 1 до 3, дезсредство следует отнести ко 2 классу опасных средств и использовать в МО при заключительной дезинфекции с обязательным применением индивидуальных средств защиты органов дыхания, кожных покровов и глаз в отсутствие пациентов.

При зоне острого токсического действия, равной от 3 до 10, дезсредство следует отнести к 3 классу умеренно опасных и использовать в МО в отсутствие больных или пациентов. Персоналу рекомендуется работать без средств защиты органов дыхания и глаз, но избегать попадания средства в глаза и на кожные покровы.

При зоне острого токсического действия более 10 ДС следует отнести к 4 классу малоопасных средств и рекомендовать для использования в присутствии пациентов.

1) Ингаляционную опасность при повторном воздействии дезсредства (аэрозоли и/или пары) оценивают по зоне подострого токсического действия: при Z_{subac} менее 10 не рекомендуется использовать в присутствии пациентов, при Z_{subac} более 10 можно использовать в присутствии пациентов.

2) ДС, обладающие кожно-резорбтивным и местно-раздражающим действием в рабочих концентрациях (2-3 класс опасности) должны использоваться строго с защитой кожи рук и глаз.

3) ДС с высокими кумулятивными свойствами контролируют химико-аналитическим методом при отмывке с посуды и игрушек, которые оценивают с учетом ПДК для ДВ в питьевой воде для изучаемого ДС.

4) ДС, обладающие умеренной сенсibilизацией (2 класс опасности) (приложение 12 и 13), рекомендуются для использования в МО обученным персоналом строго со средствами защиты в отсутствие людей (в очагах) и больных, с последующей уборкой и проветриванием помещений.

5) ДС, обладающие слабым сенсibilизирующим действием (3 класс опасности), рекомендуются для дезинфекции в МО с соблюдением мер предосторожности.

6) К работе с такими ДС не допускается персонал с аллергическими заболеваниями и повышенной чувствительностью к химическим веществам.

7) ДС, не обладающие сенсibilизирующим действием, могут широко использоваться в МО.

8) Режим отмыва ИМН от дезсредства удовлетворяет требованиям безопасного использования, если вытяжки или смывы:

не оказывают ЦТД в культуре клеток, и ни одна из опытных клеточных культур не имеет степень более 1;

по пирогенности не вызывают эффекта;

вызывают гемолитическое действие, не превышающее 2%.

9) На основании полученных данных составляют разделы в методические указания по применению ДС в МО с характеристикой его по токсичности и опасности, разработкой необходимых мер предосторожности с рекомендациями мер индивидуальной защиты, а также мер первой помощи при случайном отравлении. Меры предосторожности при работе и хранении средства, а также режимы удаления его с поверхности различных ИМН после обработки.

98. Критерии отбора дезинфицирующих средств, используемых в быту.

Могут быть рекомендованы для использования в быту населением с соблюдением необходимых мер предосторожности ДС, относящиеся к 3 и 4 классу опасности при разных путях (в желудок, на кожу) поступления в организм, с отсутствием или слабо выраженными местно-раздражающим и сенсibilизирующими действиями.

1) Ингаляционная опасность ДС (аэрозоль или аэрозоль и пары) оценивается по зоне острого и подострого токсического действия.

2) Рекомендуются ДС с зоной токсического действия более 10 и относящиеся к 4 классу опасности.

3) Рекомендуются ДС, не обладающие кумулятивными свойствами.

4) Составляется этикетка по применению ДС с обоснованием необходимых мер предосторожности.

1. Критерии отбора дезинфицирующих средств, предназначенных для предприятий пищевой промышленности.

Не допускаются к использованию ДС:

1) содержащие отдушки;

2) относящиеся к 1 классу опасности при потенциально опасных путях поступления в организм (через рот, кожные покровы, ингаляционно);

3) с выраженными отдаленными проявлениями действия;

4) с выраженным кожно-резорбтивным действием;

- 5) с выраженным сенсibiliзирующим действием;
- 6) обладающий выраженной кумуляцией в организме.

99. Для ДС отрабатывается режим отмыва до безопасных остаточных количеств средства.

99. Разрабатывается инструкция по применению ДС в практике предприятий пищевой промышленности с характеристикой токсичности и опасности средства, с разработкой необходимых мер предосторожности и рекомендациями по применению средств индивидуальной защиты, а также мер первой помощи при случайном отравлении.

5.6. Методы изучения токсичности и опасности кожных антисептиков.

100. Основопологающие токсиколого-гигиенические требования по безопасности кожных антисептиков сводятся к недопущению, прежде всего, лимитирующих эффектов их воздействия - местно-раздражающего, кожно-резорбтивного и контактного сенсibiliзирующего действия в рекомендованных режимах применения. Кожные антисептики не должны также обладать специфическими отдаленными эффектами (эмбриотоксическим, гонадотропным, тератогенным, мутагенным, бластомогенным).

101. В целом, схема оценки кожных антисептиков совпадает со схемой изучения дезинфицирующих средств. К особенностям оценки относится изучение их токсичности при реальном пути поступления в организм - на кожном. Учитывая это, в эксперименте основное внимание уделяется оценке таких лимитирующих эффектов - как местно-раздражающий, кожно-резорбтивный и сенсibiliзирующий при остром, подостром и хроническом воздействии, а также определение ингаляционной опасности кожных антисептиков в насыщающей концентрации паров (C_{20}). Следует также учитывать, что подавляющее большинство антисептиков выпускается в готовой к применению форме, а не в концентратах, и наносится на небольшие по площади участки кожи (5% от общей поверхности кожи).

5.6.1 Перечень необходимых показателей токсичности и опасности кожных антисептиков.

102. Перечень определяемых и оцениваемых показателей токсичности и опасности кожных антисептиков, в целом, совпадает с перечнем, предусмотренным для дезинфицирующих средств:

- Острая токсичность при введении в желудок - LD_{50} ;
- Острая токсичность при нанесении на кожу - LD_{50} ;
- Острая ингаляционная опасность в насыщающих концентрациях паров - C_{20} ;
- Местно-раздражающее действие на интактную кожу;
- Местно-раздражающее действие на поврежденную кожу;
- Раздражающее действие на слизистые оболочки глаза;
- Кожно-резорбтивное действие ;

- Сенсибилизирующее действие;
- Эмбриотропное, тератогенное и мутагенное действия (по показаниям);
- Испытания средства в практических условиях;
- Разработка рекомендаций по мерам предосторожности при работе и хранении средства (для включения в текст Этикетки, Инструкцию по применению и Технические условия на производство).

103.Одной из особенностей изучения кожных антисептиков, предназначенных для обработки операционных и инъекционных полей, является изучение их местного действия на "скарифицированную" (поврежденную) кожу.

5.6.2 Критерии оценки токсичности, опасности и отбор кожных антисептиков.

104.Бракуются и снимаются с дальнейшего изучения кожные антисептики у которых обнаруживают острую токсичность на уровне:

- ЛД₅₀ при нанесении на кожу 2500 мг/кг и менее (1-3 классы опасности по ГОСТ 12.1.007-76);
- ЛД₅₀ при введении в желудок менее 151 мг/кг (1-2 классы опасности по ГОСТ 12.1.007-76);
- ЛД₅₀ при введении под кожу 150 мг/кг и менее (1-3 классы токсичности по классификации К.К. Сидорова).

105.Бракуются также кожные антисептики, обладающие местным раздражающим действием при 2-х недельном воздействии на кожу в 10-ти нормах расхода; обладающие сенсибилизирующим действием.

106.Ограничивается сфера применения кожных антисептиков, обладающих кожно-резорбтивным эффектом в 10-тикратно завышенной норме расхода при 2-х недельном воздействии на кожу: такие средства разрешаются только для обработки инъекционных и операционных полей и локтевых сгибов доноров.

107.Дезинфицирующие средства, оказывающие раздражающее, кожно-резорбтивное и сенсибилизирующее действие, не могут использоваться в качестве кожных антисептиков.

108.Активно действующие вещества (субстанции), обладающие выраженными кожно-резорбтивными, контактными аллергенными свойствами, а также (по данным литературы) отдаленными специфическими проявлениями интоксикации (мутагенное, канцерогенное, эмбриотропное, тератогенное и гонадотоксическое действие) не подлежат включению в разрабатываемые рецептуры.

109.Сфера безопасного применения кожного антисептика устанавливается по степени выраженности кожно-резорбтивного и местно-раздражающего действия в зависимости от величины коэффициента запаса по отношению к норме расхода.

110.Средства, имеющие коэффициент запаса более 10 от нормы расхода (4 класс) допускаются для широкого применения: обработки рук хирургов, гигиенической обработки рук, кожных покровов инъекционного и

операционного поля, гигиенической обработки рук работников коммунальной сферы и населения.

111.Кожные антисептики, характеризующиеся 10-ти кратным коэффициентом запаса (3 класс) допускаются, в основном, для использования профессиональным контингентом (обработка рук медперсонала и хирургов).

112.При 3-х кратном коэффициентом запаса (2 класс) средства допускаются для эпизодического применения (обработки кожи операционного и инъекционного полей).

113.При обнаружении токсикологических проявлений уже в норме расхода (1 класс) применение средств не разрешается.

5.7 Перечень необходимых токсикологических показателей при оценке токсичности и опасности дезинфицирующих средств.

114.Безопасность дезинфекционных средств обеспечивается путем соблюдения требований к нормативным показателям токсичности и безопасности дезинфекционных средств согласно Решения Евразийской экономической комиссии от 28.05.10г. №299. [ссылка <https://www.alt.ru/tamdoc/19kr0078/>]

Глава 6. Химико-аналитическая оценка состава и физико-химических свойств дезинфекционных средств.

115. Наряду с оценкой безопасности и целевой эффективности ДС различного назначения, химико-аналитические определения тех или иных значимых компонентов их состава и физико-химических свойств являются непременным требованием при их экспертной оценке для государственной регистрации, а также при контроле качества дезинфекционных средств, как уполномоченными органами, так и самими производителями, дилерами и потребителями этой продукции.

116.Химико-аналитическая экспертиза дезинфекционных средств как продуктов сложного состава далеко не всегда требует их полного анализа. В подавляющем большинстве случаев она может быть ограничена количественным определением остаточных количеств основных активно действующих веществ (субстанций), обуславливающих целевую эффективность дезинфекционных средств. Как правило, именно действующее вещество является и наиболее значимым токсичным компонентом средства.

117.В каждом конкретном случае химико-аналитические исследования дезинфицирующих средств должны быть проведены теми методами и оценены по тем критериям, которые установлены документами производителя средства: стандартом организации, инструкцией по применению и стандартный образец действующего вещества дезинфекционного средства. Обязательным условием оценки качества дезинфекционных средств является количественное определение действующих веществ, при этом нормы содержания действующих веществ должны быть установлены документами производителя средства (стандарт

организации, техническим условием, методические указания, инструкция по применению).

118. Для анализа действующих веществ в дезинфекционных средствах могут быть использованы также другие, не приведенные ниже методики анализа, обеспечивающие достаточную точность, воспроизводимость и сходимость результатов.

119. За результат анализа принимают среднее арифметическое 2-х определений, абсолютное расхождение между которыми не должно превышать допустимое расхождение, равное 0,5 %.

120. Допустимая относительная суммарная погрешность результата анализа указывается в установленных документах (методы контроля в инструкциях производителя и аттестованные стандарты исследований)

121. Разброс значений процентного содержания действующих средств не должен превышать 10 %.

122. Дезинфицирующие средства представляют собой составы в различных формах концентрата, жидкости, порошка, гранул, салфеток, аэрозолей и в других готовых формах

В дезинфицирующих и стерилизующих средствах ДВ, в основном, являются:

- галоидоактивные (хлор, бром и йодактивные соединения);
- кислородоактивные соединения (перекись водорода, ее комплексы с солями, над- уксусная кислота, озон);
- альдегиды (глутаровый альдегид, глиоксаль, ортофталевый альдегид, янтарный альдегид);
- четвертичные аммониевые соли (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др. из ряда катионных ПАВ);
- производные гуанидина (соли полигексаметиленгуанидина, полигексаметиленбигуа-нидина и хлоргексидин биглюконат);
- третичный алкиламин - N,N-бис(3-аминопропил) додециламин;
- низшие жирные спирты (этиловый, изопропиловый и н-пропиловый);
- фенольные соединения [2-бифенилол, 2-бензил-4-хлорфенол, 5-хлор -2-гидрокси-дифенилметан, 5-хлор-2-(2,4-дихлорфенокси) фенол и др.];
- кислоты (органические и неорганические);
- щелочи;
- метасиликат натрия и другие.

123. В состав дезинфекционных средств входят действующие вещества из разных классов химических соединений. Часто эти средства наряду с действующими веществами содержат функциональные добавки (моющие компоненты, синергисты, антикоррозионные добавки, растворители, регуляторы pH, красители, отдушки и пр.), придающие им дополнительные полезные свойства.

124. Для контроля качества дезинфекционных средств используют следующие методы: органолептические (внешний вид, цвет и запах), физико-химические показатели, как водородный показатель или показатель активности водородных ионов (pH) самого средства или его водных

растворов, плотность при 20°C, показатель преломления 20°C, коэффициент пропитки салфеток, относительную или удельную вязкость. Таблетирование формы испытывают на ДВ, распадаемость и (или) растворимость и др. Поскольку в качестве действующих веществ в дезинфекционных средствах применяются вещества из разных классов химических соединений, для количественного определения действующих веществ используются разнообразные методы химического анализа: гравиметрические, титриметрические, титриметрия в различных вариантах, прямое и обратное титрование, кислотно-основное титрование, фотоколориметрические, спектрофотометрические, методы газовой-хроматография (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и др. Или любые другие методы, подходящие для данных целей по аппаратурному исполнению в соответствии с методическими указаниями, инструкции по применению ТУ или Стандартов организации.

125. Для определения целевой эффективности и безопасности дезсредств, непременным условием при государственной регистрации в Министерстве здравоохранения Казахстана является оценка объективности представленных производителем или регистрантом сведений по их стабильности, срокам годности и методам контроля качества. Наличие последних является обязательным условием практического использования любых дезсредств для обеспечения возможности текущего контроля их качества как органами Государственного санитарно-эпидемиологического надзора, так и производителями, поставщиками и потребителями этой продукции.

Глава 7. Методы определения целевой эффективности средств дезинсекции.

127. В каталогах Международной организации по стандартизации (ISO) сейчас зарегистрировано около 250 действующих веществ (ДВ), используемых в качестве инсектицидов. Существует три основных подхода к их типизации:

1) по химическому составу различают хлорорганические и фосфорорганические инсектициды, карбаматы (производные карбаминовой кислоты), природные пиретрины и синтетические пиретроиды, а также препараты, содержащие неорганические вещества – мышьяк, препараты серы, минеральные масла (классификация эта достаточно условна, так как возможно появление совершенно новых классов инсектицидов);

2) в зависимости от способа проникновения в организм насекомого различают инсектициды контактного (через наружные покровы), кишечного (поглощаемые с пищей) и фумигантного (через органы дыхания), а также смешанного действия – например, контактного и кишечного одновременно; в этом ряду особняком стоят системные инсектициды (вводимые непосредственно в охраняемый организм), но они в практике медицинской дезинсекции почти не применяются;

3) по степени ядовитости для человека и теплокровных животных инсектициды делят на четыре группы: сильнодействующие (LD_{50} до 50 мг/кг),

высокотоксичные (LD_{50} в пределах 50-200 мг/кг), среднетоксичные (LD_{50} от 200 до 1000 мг/кг) и малотоксичные (LD_{50} более 1000 мг/кг);

128. На основе инсектицидов всех перечисленных групп и классов разные производители выпускают в общей сложности тысячи разных препаратов под своими фирменными названиями, что порождает множество синонимов. При этом мировой ассортимент инсектицидных средств постоянно обновляется, в связи с новыми проявлениями резистентности у насекомых, так и благодаря стремлению к выпуску более эффективных и безопасных для людей и окружающей среды препаратов.

129. Выбор методов определения целевой эффективности инсектицидных и репеллентных средств зависит, прежде всего, от рекомендованной производителем формы их применения и предназначения: форма применения определяет способ оценки целевой эффективности средства, а предназначение – выбор объектов воздействия при проведении лабораторных испытаний. Современные инсектицидные и репеллентные средства чрезвычайно разнообразны как по формам выпуска, так и по специфическому предназначению.

130. Различный характер химических соединений, используемых в качестве пестицидов, и многообразие объектов воздействия вызывают необходимость разных форм применения. В зависимости от физико-химических свойств препарата, его назначения и способа использования выбирается наиболее эффективная и экономичная в данных конкретных условиях форма применения. На ее выбор большое влияние оказывает также токсичность средства: форма применения должна обеспечивать не только наиболее эффективное, но и максимально безопасное использование любого препарата.

131. Анализ существующих форм выпуска инсектицидов и репеллентов, а также рекомендуемых производителями способов проведения медицинской дезинсекции, позволяет выделить следующие группы инсектицидов и формы их применения:

1) водорастворимые концентраты эмульсий или суспензий, в том числе микрокапсулированных, а также водосмачивающиеся порошки, которые для проведения дезинсекции используются в виде водных рабочих растворов разной концентрации, зависящей, как правило, от видовой резистентности объекта воздействия;

2) растворимые в органических растворителях средства, предназначенные для использования профессиональным контингентом с помощью специальной техники (термогенераторы) в виде аэрозолей (туманы и дымы) в ультра-малых объемах (УМО);

3) порошковидные средства (дусты) и их структурированные варианты (мелки, карандаши и т. д.);

4) таблетированные и гранулированные средства – чаще всего фумигантного действия, в том числе с приманочным эффектом;

5) инсектицидные и репеллентные кремы, гели, мази и лосьоны;

б) жидкие и твердые (пластины или маты) инсектицидные средства фумигантного действия, применяемые с помощью электрофумигатора;

7) пиротехнические инсектицидные средства (свечи, спирали, шнуры, таблетки, шашки);

8) инсектицидные и репеллентные средства в аэрозольной (пропеллентной или безпропеллентной) упаковке, предназначенные преимущественно для самостоятельного использования населением;

9) биологические средства борьбы с насекомыми (преимущественно с личинками комаров на основе кристалло-спорообразующих бактерий *Bac. thuringiensis, subsp. israelensis*);

10) биологические или генетические средства борьбы с насекомыми, предназначенные для подавления их метаморфоза или размножения (ингибиторы синтеза хитина – ИСХ, аналоги ювенильного гормона – АЮГ, хемостерилилянты), часто совмещаемые с использованием аттрактантов и механических приспособлений (специальные контейнеры), способствующих активному контакту насекомых с препаратом;

11) механические средства борьбы с насекомыми на основе липких композиций (липучие ленты, клеевые листы, подстилки и ловушки) или тонкоразмолотых силикатов и минеральных масел, нарушающих функции дыхательных органов насекомых;

12) физические средства борьбы, в том числе ультрафиолетовые уничтожители насекомых и ультразвуковые устройства для их отпугивания.

22. По своему предназначению все инсектициды, если не касаться видовой принадлежности их объектов воздействия, в упрощенном виде можно подразделить на следующие группы:

1) препараты для уничтожения имаго ползающих насекомых и других членистоногих;

2) препараты для уничтожения имаго летающих насекомых;

3) препараты смешанного действия – для уничтожения имаго ползающих и летающих насекомых;

4) препараты для уничтожения насекомых на ранних стадиях их метаморфоза (личинок и/или яиц).

5) препараты для отпугивания имаго ползающих и летающих насекомых или репелленты.

132. Определение целевой эффективности инсектицидных и репеллентных препаратов всех перечисленных групп может проводиться в ходе натуральных (полупроизводственных) испытаний, то есть непосредственно в рекомендованном производителем режиме применения. Перед началом натуральных испытаний проводится учет численности особей целевого вида любым пригодным для этой цели способом (подсчет на единицу площади или времени, использование ловушек, ламп, клеевых листов, липучих лент и т. д.), определяемым особенностями экологии каждого конкретного объекта воздействия. По истечении предусмотренного инструкцией по применению препарата срока его активного действия производится контроль остаточной численности насекомых тем же методом, что и предобработочный учет.

Эффективность препарата соответствует проценту гибели особей в популяции объекта воздействия. В большинстве случаев испытуемое средство признается эффективным при гибели насекомых в пределах 90-100%, а при испытаниях на видах с заведомо повышенной резистентностью (блохи жилья *Pulex irritans*, рыжие тараканы *Blattella germanica*) – в пределах 70-80%. При показателе ниже 70% натурные испытания повторяют на другом объекте. Если и в повторных испытаниях регистрируют недостаточную целевую эффективность, то средство бракуется.

При натуральных испытаниях допускается проведение визуальных (глазомерно-балльных) предотрабочных и послеотрабочных учетов численности целевых насекомых. В этом случае испытуемый препарат признается эффективным при полном исчезновении объекта воздействия в обработанных помещениях или резко выраженном снижении его численности (наличие единичных живых насекомых).

Последствие (остаточная эффективность) препарата в натуральных испытаниях определяется путем проведения в соответствующие сроки повторного контроля численности насекомых в помещениях обработанного объекта, в которых не проводилась влажная уборка.

133. Лабораторное определение целевой эффективности инсектицидных и репеллентных препаратов проводят путем постановки экспериментов, соответствующих рекомендованной форме применения средства, не менее чем в двух, а при получении неудовлетворительного результата в одном из экспериментов не менее чем в трех повторностях с обязательным контролем в каждом опыте. При параллельном проведении сразу двух опытов, контроль для них может быть общим. При гибели в контроле больше 20% насекомых, опыт не засчитывается, а при гибели от 5 до 20% вводят поправку по Абботу:

$$\text{Истинная смертность, \%} = \frac{\text{живые в контроле, \%} - \text{живые в опыте, \%}}{\text{живые в контроле, \%}}$$

При наличии трех и более повторностей одного и того же эксперимента либо при проведении множественных опытов (например, оценка репеллентных свойств на добровольцах) их результаты подлежат обязательной статистической обработке корректными для каждого конкретного случая методами (вычисление средних и ошибок средних, определение доверительного интервала, достоверность разности долей по Стьюденту или Фишеру и т. д.)

134. Лабораторные опыты на инсектарных культурах насекомых в целях получения сравнимых данных проводят на особях определенного возраста и пола, питавшихся стандартным кормом. Во время испытаний температуру воздуха поддерживают в режиме $21 \pm 2^\circ\text{C}$, относительную влажность – в пределах $56 \pm 3\%$. При изучении биологической активности инсектицидных и репеллентных средств чаще всего используют следующих членистоногих:

- 1) комнатные мухи *Musca domestica* – имаго самки и самцы 3-5-дневного возраста, питавшиеся молоком и сахарной водой; личинки III возраста, развивающиеся во влажных отрубях;
- 2) постельные клопы *Cimex lectoralis* – имаго самки и самцы 5-дневного возраста, накормленные за 3 часа до опыта на морской свинке или кролике;
- 3) рыжие тараканы *Blattella germanica* – накормленные имаго самки и самцы 5-7-дневного возраста;
- 4) крысиные блохи *Xenopsylla cheopis* – имаго самки и самцы 5-дневного возраста, накормленные на белой мыши за 3 часа до опыта; личинки II и последнего возрастов.
- 5) платяные вши *Pediculus humanis corporis* – имаго самки и самцы 15-дневного возраста, накормленные не ранее чем за 1 час до опыта;
- 6) комары *Aedes aegypti* – имаго самки 5-дневного возраста, накормленные сахарной водой за 3 часа до опыта; личинки II, III или начала IV возрастов, развивающиеся в водопроводной хлорированной воде, отстоянной в течение 24 часов;
- 7) клещи *Ixodes persulcatus* – имаго в возрасте 3 месяцев, голодные; нимфы в возрасте до 3 месяцев, голодные;
- 8) чесоточные (ушные кроличьи) клещи *Psoroptes cuniculi* – самки;
- 9) гемазовые клещи (паразиты крыс) *Bdellonyssus bacoti*, имаго;
- 10) гусеницы платяной моли *Tineola bisselliella* месячного возраста;
- 11) личинки кожееда *Attagenus smirnovi* двухнедельного возраста;
- 12) муравьи-рабочие любого вида.

При изучении кишечного действия препаратов в опытах используют голодных мух, тараканов, которым за 12 часов до опыта дают только воду, но не дают пищи. При изучении инсекторепеллентной активности веществ используют голодных имаго блох 1-3-недельного возраста и голодных имаго комаров 8-10-дневного возраста, не питавшихся кровью. Оценка акарорепеллентных средств проводится на активных нетравмированных самках клеща *Ixodes persulcatus*. При этом допускается использование для проведения испытаний насекомых и клещей, собранных в природных условиях.

135. Лабораторные испытания целевой эффективности препаратов, которые для проведения дезинсекции используются в виде водных рабочих растворов, а также препаратов в аэрозольной упаковке, предназначенных для борьбы с ползающими насекомыми, проводят следующими методами.

1) Экспресс-метод. Препараты, предназначенные для борьбы с ползающими насекомыми, а также для обработки мест посадок летающих насекомых испытывают упрощенным способом, доступным даже в полевых условиях. Для работы необходимы эмалированный таз, бумажный или картонный круг, соответствующий по величине дну таза, 6-8 пробирок. В опыт берется 60-100 блох одного вида из инсектария либо из естественных местообитаний (возможно также проведение экспериментов на муравьях); 30 блох оставляют в трех пробирках в качестве контроля, а остальных используют в эксперименте. Испытываемый препарат наносят на поверхность бумаги с помощью кисти или пульверизатора в пересчете рекомендованной для

помещений концентрации и дозы ДВ 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 во избежание расползания. Время экспозиции для синтетических пиретроидов – 3-5 минут, для инсектицидов других групп – от 1 до 24 часов. После контакта с ядом блох стряхивают в таз, откуда рассаживают в пробирки по 10 экз.

Результаты опытов в первый день учитывают каждый час, фиксируя число насекомых без признаков паралича, с эффектом нокдауна и погибших. Окончательные итоги подводят при работе с пиретроидными препаратами через 24 часа, с препаратами других групп – на 2-5 сутки. При этом в двух повторностях гибель блох должна составлять не менее 98%. В этом случае испытываемый препарат считается пригодным для дезинсекции в рекомендуемых дозировках. Стабильность и длительность последствия препарата определяют с использованием того же импрегнированного бумажного круга, хранящегося на открытом воздухе, через нужные промежутки времени.

Если в результате опытов процент гибели блох колеблется от 50 до 98, то целесообразно удвоить концентрацию действующего вещества либо, если это невозможно, удвоить количество яда на бумажном круге. Получение в этих случаях высокой эффективности в опыте дает основание применять яд для дезинсекции в повышенной концентрации. Если и при повышенной концентрации пулецидная эффективность окажется ниже 98%, то инсектицид признают непригодным.

При необходимости проверки действенности испытываемого средства на впитывающих и не впитывающих поверхностях, повторный опыт проводят путем аналогичной обработки ядом не бумажного (картонного) круга, а непосредственно дна эмалированного таза.

Описанным методом можно определять также минимальную экспозицию пестицида, обеспечивающую нужные показатели гибели насекомых. При этом с помощью импрегнированного бумажного круга время их контакта блох с ядом может быть точно дозировано – от моментального (1-3 секунды) до многочасового.

2) Оценку эффективности жидких препаратов на тех видах, для которых предназначено испытываемое средство, проводят в камере объемом 1-2 м³, снабженной вентиляционной системой. На дне камеры на площади 0,5 м² равномерно размещают в 3-5 точках насекомых по 10 экземпляров в 0,5 литровых банках (вшей при проверке педикулицидной активности размещают на кусочках бязи). Для определения в дальнейшем остаточного действия средства здесь же по 3-5 штук помещают образцы поверхностей (пластинки стекла или кафеля и фанеры размером примерно 10×20 см). Насекомых и поверхности орошают препаратом из пульверизатора или опрыскивателя с высоты 50 см, направляя струю средства под углом 45° к дну камеры. Норма расхода рабочей жидкости 50 мл/м².

Насекомых и образцы поверхностей через 10 минут после орошения удаляют из камеры и переносят в чистую посуду. За их состоянием наблюдают в

течение 5 часов, отмечая через 10, 30 минут и каждый час, далее ежедневно в течение трех суток, число насекомых без внешних признаков паралича, парализованных и погибших. Остаточное действие средства определяют через нужные промежутки времени методом контакта насекомых с обработанными поверхностями в течение 15 минут в экспозиметрах.

Показатели эффективности: острое действие – гибель через 24-72 часа не менее 100%; остаточное действие – гибель в те же сроки при посадке на обработанные поверхности не менее 50% насекомых.

136. Лабораторные испытания целевой эффективности инсектицидных и инсектоакарицидных порошков проводят следующими методами.

1) Экспресс-метод – модификация метода опыленных пробирок. В опыт берется 60-100 блох одного вида из инсектария либо из естественных местообитаний (возможно также проведение экспериментов на муравьях); 30 блох оставляют в трех пробирках в качестве контроля. Затем в обезжиренные пробирки для опытов засыпают dust и после неоднократного встряхивания для достижения его равномерного распределения по стенкам пробирки – полностью высыпают, аккуратно постукивая твердым предметом по пробирке. Известно, что при этом способе на стенках пробирки остается в среднем 6 мг (4,3-7,1) dusta, что составляет около 0,1 мг на 1 см². В обработанные пробирки на 1-3 секунды помещают по 10 блох, после чего их пересыпают в пробирки с чистым субстратом. Наблюдения за смертностью насекомых ведут в течение 5 часов, отмечая через 10, 30 минут и каждый час, а далее ежедневно на протяжении 3-5 суток, число насекомых без признаков паралича, парализованных и погибших.

Показатели эффективности: острое действие – гибель через 24-72 часа не менее 100%; остаточное действие – гибель в те же сроки при посадке на обработанные поверхности не менее 80% насекомых.

2) Оценка эффективности dustов на инсектарных культурах рыжих тараканов и комнатных мух проводится следующим образом. Берется навеска dusta, соответствующая рекомендованной для данного средства норме расхода из расчета не на 1 м², а на площадь тест-поверхности. В качестве последней используют пластинки из фанеры размером 10×20 см. Навеску dusta равномерно распределяют по площади пластинки. Насекомых подсаживают в экспозиметрах на обработанную поверхность примерно на 30 сек, а затем переносят в чистую посуду. При определении острого действия посадку насекомых проводят сразу после нанесения dusta. При определении остаточного действия – насекомых подсаживают через 3 суток после обработки поверхности. Учет гибели насекомых и показатели эффективности те же, что и при экспресс-методе.

137. Определение целевой эффективности средств против педикулеза проводится следующими способами.

1) При оценке эффективности средств, предназначенных для борьбы с платяным педикулезом, образцы бязи размером 10×10 см обрабатывают средством (эмульсией, раствором, суспензией, dustом). Жидкие формы используют из расчета 100 мл/м², dust равномерно распределяют по

поверхности в рекомендуемых нормах расхода, чаще всего это 10 г/м². Образцы бязи, обработанные жидким средством, после высыхания помещают в чашки Петри и на них подсаживают не менее 20 особей вшей (10 имаго и 10 личинок III возраста). Срок контакта насекомых со средством составляет от 5 до 60 мин в зависимости от рекомендованной экспозиции.

2) При оценке средств, предназначенных для борьбы с головным педикулезом, пряди волос (или полиамидные волокна) обрабатывают средством из расчета 1 мл / 10 см² волос или волокон. Насекомых подсаживают на обработанные волосы на срок от 5 до 60 мин. После контакта волосы с насекомыми промывают теплой водой с мылом или шампунем и переносят на фильтровальную бумагу для подсушивания. После этого насекомых переносят в чашки Петри на чистые образцы бязи, которые помещают в термостат при температуре 28±2°С.

3) Метод погружения. Вшей или личинок III возраста, как наиболее устойчивых к инсектицидам, в количестве 30 штук помещают в марлевые салфетки (5×5 см) и погружают в рабочие жидкости средства или в dust на сроки от 5 до 60 минут в зависимости от рекомендованной экспозиции. По окончании опыта насекомых промывают теплой водой, просушивают на фильтровальной бумаге и переносят в чашки Петри на чистые кусочки бязи и помещают в термостат при температуре 28±2°С.

4) При анализе эффективности педикулицидных мазей и гелей, их с помощью кисточки наносят на насекомых из расчета 1 г / 10 см² на период от 1 до 60 минут. После воздействия мази на вазелиновой основе или геля насекомых промывают теплой водой с добавлением мыльного крема для бритья или шампуня для мытья волос. После контакта насекомых переносят на чистые куски бязи в чашки Петри, которые помещают в термостат для дальнейших наблюдений при температуре 28±2°С.

5) Оценку эффективности педикулицидных средств в виде аэрозольных упаковок проводят в камере объемом 0,75 м³, площадью 0,5 м². Ткани с посаженными на них насекомыми (имаго и личинки III возраста), орошают струей аэрозоля, направляя ее с высоты 50 см под углом 45°. Норма расхода средства составляет 10 или 20 г/м². Количество нанесенного средства определяют по разности веса баллона до и после выпуска смеси и далее рассчитывают расход действующего вещества, исходя из состава содержимого упаковки. Через 10 минут после орошения тканей подопытных насекомых пересаживают на чистые кусочки бязи в чашки Петри и помещают в термостат для дальнейшего наблюдения.

Показателем удовлетворительной педикулицидной эффективности при всех перечисленных выше способах ее оценки является полная гибель вшей не позднее чем через 24 часов после обработки.

138. Оценка эффективности инсектицидных карандашей, мелков, брусков проводится на любых насекомых следующим образом. В качестве тест-поверхности используется кусок фанеры размером 10×20 см, которую предварительно точно взвешивают. Затем на нее наносят в соответствии с рекомендованной нормой расхода из расчета на 200 см² тестируемое средство,

закрашивая тест-поверхность карандашом, мелком или бруском. Для контроля нормы расхода обработанную пластинку вновь взвешивают. При необходимости средство удаляют или же добавляют. При определении острого действия подсадку насекомых в экспозиметрах на 30 секунд проводят сразу же после нанесения средства, затем их переносят в чистую посуду. При определении остаточного действия насекомых подсаживают через трое суток после обработки поверхности. В обоих случаях учет результатов проводят через 24 часа, средство признается эффективным при гибели всех насекомых в опыте.

139. Оценку инсектицидной активности средств в аэрозольной упаковке, предназначенных для борьбы с летающими насекомыми, проводят на комнатных мухах, комарах или замещающих их видах. В камеру объемом 2 м² выпускают 30-50 насекомых. Струю аэрозоля из баллона направляют в камеру, расход смеси не должен превышать 1 г/м³. При помощи секундомера определяют время (Т) поражения 99% насекомых. Определяют концентрацию (С) инсектицида в воздухе по уравнению:

$$C = \frac{Q \times Z}{V}, \text{ где}$$

Q – количество смеси, выпущенной из аэрозольного баллона или беспропеллентной упаковки в камеру, определяемое по разности веса упаковки до и после опыта;

Z – доля инсектицида в пересчете на действующее вещество (мг/г), определяемая составом наполнителя;

V – объем камеры.

Эффективность определяют по импульсу концентрации (СТ). Критерием оценки служит условно принятая величина концентрации инсектицида С₁₅, которая вызывает поражение 99% насекомых в течение условно принятого времени – 15 минут. Средство считается эффективным, если С₁₅ не превышает 25, а Q – 1500 мг/м³.

140. Оценку целевой эффективности пиротехнических средств в виде спиралей, предназначенных для борьбы с комарами проводят на имаго *Aedes aegypti* или подвальных комаров *Culex pipiens*. В камеру объемом 0,5-2 м² выпускают 30-100 имаго насекомых. Для опыта берется часть спирали в зависимости от объема камеры (требуемое количество рассчитывают в соответствии с инструкцией по применению).

Спираль поджигают и через 30 секунд устойчивого горения пламя задувают, дымящую спираль помещают в камеру на подложку из негорючих материалов. С помощью секундомера регистрируют время гибели комаров. Опыт повторяют три раза. Критерий оценки эффективности – 100% гибель имаго комаров через 15 минут.

141. Целевая эффективность пиротехнических средств, предназначенных против ползающих насекомых, определяется на рыжих тараканах инсектарной культуры или муравьях. В камеру объемом 2 м³ раскладывают по 2-3 тест-

поверхности из стекла и фанеры, в 3-5 точках помещают емкости на 0,5 л с 10 насекомыми. На подложке из негорючих материалов размещают пиротехническое средство (его требуемое количество рассчитывают в соответствии с инструкцией по применению препарата). Средство поджигают, камеру закрывают, выдерживают в течение двух часов, затем проводят подсчет погибших насекомых. Остаточное действие определяют путем подсадки насекомых в экспозиметрах на тест-поверхности через сутки после их обработки на 15 минут. Учет гибели проводят через 24 часа. Острое действие средства считается удовлетворительным, если погибли все насекомые, а остаточное – в случае гибели не менее 90%.

142. Оценку эффективности инсектицидных пищевых приманок (контейнеры или приманочные станции, шарики, брикеты, гранулы, порошки, пасты, гели, пены, растворы) для ползающих и летающих насекомых проводят следующими способами.

1) Ползающие насекомые. В бокс из оргстекла (200×200×300 мм), на верхнюю часть внутренней поверхности которого нанесена полоска вазелина шириной 2 см, препятствующая выползанию насекомых, помещают 50-100 муравьев; после этого там же располагают контейнер или на подложке инсектицидную пищевую приманку. Учеты эффективности проводят на вторые (для фосфорорганических инсектицидов, производных карбаминовой кислоты и пиретроидов) и на пятые сутки для прочих средств. Показателем эффективности является гибель не менее 70% насекомых.

2) Летающие насекомые. 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 либо специальные боксы объемом 1,0 м³. В центре бокса размещают емкость с жидкой приманкой или на подложке располагают 2 г сухой приманки (пены, пасты и т. д.). Сахарную приманку наносят на стекла и дают им подсохнуть, затем помещают в бокс или садок. Учитывают гибель мух через сутки. Эффективной считается приманка, вызвавшая гибель всех насекомых в течение суток.

143. Определение эффективности средств против летающих насекомых, применяемых в электрофумигаторах, проводят на комарах инсектарной культуры или добытых в природе путем оценки КТ₅₀ (время проявления эффекта нокдауна у 50% особей). В камеру объемом 2 м³ запускают 30-50 комаров. Инсектицидный мат (пластину) или флакон со средством помещают в электрофумигатор, включают его в сеть согласно инструкции за 15 минут (при испытании жидкостей за 60 минут) до начала опыта. Затем разогретый электрофумигатор отключают, переносят его в камеру с комарами и вновь включают. С помощью секундомера регистрируют время гибели 50% особей в камере (КТ₅₀).

Для определения резерва мата (минимального времени использования мата) определяют КТ₅₀ для комаров (по приведенному выше методу), используя маты, которые уже нагревались до опыта 5 и более часов. С помощью

секундомера регистрируют время гибели 50% особей в камере (KT_{50}). За резерв мата принимается максимальное время его нагрева в часах, при котором KT_{50} остается не более 5 минут. Удовлетворительными показателями эффективности являются KT_{50} не более 3 минут, а резерв мата – не менее 7 часов.

144. Оценку активности инсектицидов против личинок комаров проводят на личинках III возраста инсектарной культуры комара *Aedes aegypti*. Берут навеску средства (если оно жидкое, предварительно его взбалтывают) для приготовления концентрации, рекомендованной в инструкции по применению, и разбавляют водой в нужной пропорции. Затем в сосуды объемом 0,5 л наливают по 250 мл водопроводной воды, отстоянной в течение 24 часов. В каждый сосуд за 2 часа до опыта помещают по 25 личинок III возраста. Затем в них добавляют 1 мл раствора (эмульсии, суспензии) готового раствора инсектицида. В период эксперимента температура воды должна находиться в пределах $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Подсчет погибших личинок проводят через 24 часа (удовлетворительный результат – 100% погибших). Если более 10% личинок в контроле окуклились, опыт не учитывают и повторяют.

145. Целевая эффективность механических средств борьбы с насекомыми на основе липких композиций определяется следующими способами.

1) Оценку эффективности липких ловушек проводят на рыжих тараканах инсектарной культуры. Для этого используется бокс из оргстекла ($20 \times 20 \times 30$ см), на верхнюю часть внутренней поверхности которого нанесена полоска вазелина шириной 2 см, препятствующая выползанию насекомых. В бокс 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. Учеты эффективности проводят через 7 и 14 дней. Средняя уловитость на 7 суток должна быть не менее 92%; на 14 – не менее 97%; Ресурс ловушки – 1 таракан на 1 см липкой поверхности.

2) Эффективность клейких (липких) ловушек в виде листов, лент и палочек для борьбы с летающими насекомыми проводится на комнатных мухах инсектарной культуры. Для этого используются большие садки ($50 \times 50 \times 50$ см), представляющие собой каркасы с натянутыми на них марлевыми или газовыми садками. Липкие листы, предварительно разъединив или сняв с них защитный бумажный слой, помещают по одному в садок. Липкие палочки и ленты освобождают от защитного слоя бумаги подвешивают в садке. После этого в садок (камеру) выпускают 30-50 комнатных мух. Количество прилипших мух подсчитывают на 2 суток. Показатели эффективности: средняя уловитость на 2 суток не менее 96%. Ресурс ловушки – 1 муха на 1 см² липкой поверхности.

146. При оценке активности регуляторов развития насекомых (РРН) основным условием 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, а при оценке активности

ингибиторов синтеза хитина (ИСХ) – личинок II возраста для любых биологических объектов.

Проверка эффективности этих препаратов ведется, как правило, на личинках комара *Aedes aegypti* IV возраста; личинках крысиных блох *Xenopsylla cheopis*, комнатных мух *Musca domestica*, рыжих тараканов *Blattella germanica*. В то же время принципиальных отличий в постановке опытов для разных видов практически нет. Поэтому можно ограничиться рассмотрением оценки эффективности АЮГ на двух примерах.

1) В субстрат для развития личинок крысиных блох (тонкий слой песка, предварительно, во избежание заплесневения, прокаленный в течение 2 часов и смешанный с сухим стандартным альбумином и пивными дрожжами из расчета 3 г альбумина на 10 г песка) вносят раствор препарата АЮГ в ацетоне. После испарения растворителя по 30 личинок блох помещают в субстрат. Эффективность оценивают, подсчитывая ежедневно личинок с нарушением метаморфоза. Показатели эффективности – деформированных личинок через 3 суток должно быть не менее 95%.

2) Эффективность пищевых приманок на основе АЮГ и ИСХ для мух. Пищевую приманку с регулятором развития насекомых ставят в садок размером 30×30×30 см, в который запускают 50-100 имаго 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. Показатели эффективности – стерильность самок, то есть отсутствие яйцекладок на 5 сутки, количество жизнеспособных яиц – не более 5%, количество деформированных личинок через 2-3 суток – не менее 95%.

147. Методы оценки эффективности репеллентных средств. Оценку инсекторепеллентной активности проводят на имаго (только самки) комара *Aedes aegypti* инсектарной культуры в возрасте 8-10 дней, получавших углеводное питание и на имаго крысиных блох *Xenopsylla cheopis* 1-3 недельного возраста, не питавшихся кровью (допускается их замена на насекомых, собранных в природных условиях). Оценка акарорепеллентных средств проводится на активных не травмированных самках клеща *Ixodes persulcatus*. Используются самки лабораторного разведения после проверки их двигательной активности или (в весенне-летний период) особи природной популяции, собранные с растительности не более, чем за сутки до проведения опытов и хранившиеся во влажных бинтах при температуре 12±2°C.

1) Оценку инсекторепеллентной активности средств, наносимых на кожу по отношению к летающим насекомым проводят на имаго (только самки) комара *Aedes aegypti* инсектарной культуры в возрасте 8-10 дней, получавших углеводное питание методом определения коэффициента отпугивающего действия (КОД). Испытуемое репеллентное средство наносится на кожу предплечья испытуемых-добровольцев (3-5 человек) при норме расхода 0,1 мл (г) на 100 см² поверхности. На кисть одевается резиновая перчатка. КОД определяют через 15 минут после нанесения средства в процентах по соотношению количества укусов на контрольном (необработанном) и

обработанном предплечье за период времени 3-5 минут. КОД, характеризующий острое репеллентное действие, вычисляют по формуле:

$$\text{КОД} = \frac{A - B}{A} \times 100, \text{ где}$$

A – количество насекомых на необработанной поверхности предплечья в течение фиксированного времени;

B – количество насекомых на обработанной репеллентом поверхности предплечья в течение того же времени.

Затем определяют длительность репеллентного действия (ДРД) – время (в часах), в течение которого происходит отпугивание от обработанной репеллентом поверхности не менее 70% активных насекомых, то есть продолжительность сохранения КОД более 70%. Определение ДРД проводится каждые 30 минут до окончания действия средства, то есть до значения КОД ниже нормативного показателя.

Показатели эффективности при КОД 70%, ДРД 100%: высшая категория – 4 часа и более, 1 категория – 3 часа и более, 2 категория – 2 часа и более, 3 категория – 1 час и более.

2) Оценка эффективности репеллентных средств, предназначенных для обработки одежды и ткани. Для этой цели используют метод ольфактометрии, а в качестве биологического объекта – имаго крысиных блох. Репелленты наносят на тесты из хлопчатобумажной ткани (бязи) и тесты проветривают в течение 1 суток. Острое действие определяют по КОД в процентах в первые сутки после обработки тестов по соотношению количества блох, оставшихся на обработанных репеллентами и контрольных тестах. Далее устанавливают ДРД в сутках по КОД, определяемому один раз в сутки, то есть до уменьшения его значения ниже нормативного показателя.

Показатели эффективности: КОД для блох 95%, ДРД 5 и более суток – высшая категория, КОД 90%, ДРД 3-5 суток – первая категория, КОД 90%, ДРД 2-3 суток – вторая категория.

3) Оценка эффективности акарорепеллентных средств проводится также методом определения КОД. Для этого используется тест из хлопчатобумажной ткани – лента (10×70 см), на которой на расстоянии 10 см от нижнего края (отметка 0) намечают отрезок длиной 10 см (площадь 100 см²). На контрольный тест ничего не наносится, а на опытный тест от отметки 0 и выше наносится средство в норме расхода 1 мл на выделенный отрезок площадью 100 см². После высыхания (через час после нанесения средства) тесты закрепляют под углом 70° к линии горизонта. Эксперимент состоит из двух этапов.

Первый этап – определение двигательной активности. Клещей по одному подсаживают на нижний край контрольного теста, на 5 см ниже выделенного участка, и в силу свойственного им отрицательного геотаксиса они двигаются вверх (для усиления стремления двигаться вверх экспериментатор должен постоянно держать палец перед клещом на расстоянии 0,5 см от гипостома).

При помощи секундомера регистрируют скорость пересечения выделенной полосы. Двигательная активность клещей признается удовлетворительной, если более чем 95% клещей пересекают полосу быстрее, чем за 1 мин.

Второй этап. После подтверждения двигательной активности клещей начинают опыт с обработанным тестом. Клещей по одному подсаживают на 5 см ниже обработанного участка и, приманивая пальцем, наблюдают, пересекают ли они обработанную полосу. Опыт проводят не менее чем с 30 самками. Процент самок, не пересекающих полосу, вычисляют по той же формуле КОД, что приведена выше. В этом случае А – общее количество клещей в опыте, В – количество клещей, прошедших обработанную репеллентом зону.

Длительность репеллентного действия (ДРД) в сутках – время, в течение которого происходит отпугивание от обработанной репеллентом поверхности не менее 95% клещей – определяют 1 раз в сутки. В промежутках между опытами тесты хранят подвешенными в проветриваемом помещении при комнатной температуре. Показатели эффективности: КОД – 95% и более, ДРД – 3 и более суток.

148. Методы оценки эффективности средств борьбы с молью и кожеедами.

1) Острое действие жидких препаратов определяется путем орошения гусениц и личинок на пищевом субстрате – сукне, а также методом свободного контакта насекомых с поверхностью образцов ткани размером 4×4 см, обработанных средством в норме расхода, указанной в инструкции по применению. Образцы ткани, обработанной средством, высушивают в течение 24 часов при комнатной температуре, на них помещают по 10 гусениц моли или личинок кожееда, затем образцы ткани с насекомыми переносят в стеклянные стаканчики, которые сверху закрывают бязью. Учет гибели ведут через 72 часа.

2) Оценку эффективности средств фумигантного действия проводят в экспериментальных емкостях-коробах объемом 0,5 м³. Емкости заполняют шерстяной одеждой, средство размещают так, как указано в инструкции по его применению. В емкость вносят по 20 бабочек моли и имаго кожеедов, последних помещают в чашках Петри. Учет гибели ведут в случае применения высоколетучих ДВ типа вальпуртрина через 24 часа, прочих средств – через 48 часов. Показатель эффективности – гибель 100% имаго моли и кожеедов.

3) Для оценки эффективности средств репеллентного действия используют ольфактометр, в который запускают 1-2 дневных имаго моли и определяют коэффициент отпугивающего действия (КОД) через 24 часа, который должен быть не ниже 75%.

149. Оценку эффективности скабицидов, предназначенных для обработки поверхностей в помещениях, одежды, белья с целью уничтожения чесоточных клещей, проводят *in vitro* на ушном кроличьем клеще *Psoroptes cuniculi* инсектарной культуры (с обязательным применением бинокулярной лупы) средства тремя методами в зависимости от препаративной формы. Показателем удовлетворительной эффективности испытываемых средств во всех случаях является полная гибель клещей в течение первых суток.

1) Метод погружения – для исследования жидких препаративных форм (эмульсии, суспензии, растворы). Самок клещей по 10 особей помещают на кружок фильтровальной бумаги, свернутой углом в виде фунтика и погружают в исследуемую рабочую жидкость на 1 минуту, а затем переносят в чистую пробирку с вложенной в нее фильтровальной бумагой. Через 24 часа определяют количество погибших клещей и подсчитывают процент пораженных особей.

2) Метод орошения – для исследования эффективности средств в аэрозольной упаковке. Клещей (10 самок) подсаживают в чашки Петри на впитывающую поверхность (фильтровальная бумага), после чего чашки Петри с клещами помещают в камеру и обрабатывают аэрозолем. На края чашек необходимо нанести полоску вазелина. Норма расхода средства определяется рекомендованным режимом его применения. Через 10 минут чашки Петри вынимают из камеры, клещей пересаживают в чистые пробирки и проводят учет гибели через 24 часа, подсчитывая процент пораженных особей.

3) Метод подсадки – для исследований эффективности дустов. Самок клещей по 10 особей подсаживают на обработанную дустом впитывающую (фильтровальная бумага) поверхность при рекомендованных для данного средства норме расхода и экспозиции. Затем клещей пересаживают в чистые пробирки и проводят учет гибели через 24 часа, подсчитывая процент пораженных особей.

Глава 8. Методы определения целевой эффективности средств дератизации.

150. Применяемые в настоящее время зооциды относятся всего к двум группам – яды острого действия и яды кумулятивного действия (антикоагулянты крови первого и второго поколений). Из первой группы широкое распространение во всем мире получил лишь фосфид цинка. Из антикоагулянтов первого поколения наиболее часто используются на современном этапе ракумин, однако, предпочтение отдается антикоагулянтам второго поколения – флюкумафену, бромодиолону и бродифакуму, которые по ряду характеристик приближаются к ядам острого действия.

151. Арсенал борьбы с грызунами также ограничен четырьмя методами – экологическим, биологическим, механическим и химическим. Основным методом, бесспорно, является химический, наиболее широко применяемый в виде одной из его модификаций – приманочного способа борьбы, когда яды подаются вместе с пищевой основой, собственно и привлекающей грызунов.

152. Средства борьбы с грызунами по формам выпуска и применения подразделяются на 4 группы:

1) готовые к употреблению приманки разного типа (зерновые, таблетированные, брикетированные, мягкие, пеллетированные и т. д.);

2) порошки, гели, пасты и жидкости, применяемые для самостоятельного приготовления отравленных приманок;

3) механические средства борьбы (преимущественно ловушки разных типов – живоловки, давилки, капканы, петли и пр., а также липкие композиции);

4) физические устройства (ультразвуковые) для отпугивания грызунов (несмотря на привлекательность с экологической точки зрения самой идеи освобождения от грызунов без их уничтожения, ультразвуковые устройства не получили пока широкого распространения – главным образом потому, что до сих пор их безвредность для людей не доказана).

153. Требования к определению целевой эффективности средств дератизации достаточно просты и сводятся к следующим основным моментам:

1) при проведении натуральных (полупроизводственных) испытаний на экспериментальных объектах необходимо проведение предобработочного и послеотработочного учетов численности грызунов любым подходящим способом, без чего невозможно оценить эффективность использованного родентицидного средства;

2) для лабораторных экспериментов желательно использовать дикие формы серых крыс (*Rattus norvegicus*), домовых мышей (*Mus musculus*) и других целевых видов, хотя допускается их замена на особей лабораторных линий;

3) оценку специфических препаратов (против одного из видов грызунов) проводят на особях целевого вида.

4) оценку универсальных препаратов (от серых крыс, домовых мышей и/или других грызунов) проводят на более резистентных ко всем ядам домовых мышах.

5) в каждом опыте используют не менее 6 взрослых зверьков в возрасте 1,5-6 месяцев (вес крыс – 180-250 г, домовых мышей – 12-27 г). Самцов и самок берут поровну. При наличии трех повторностей в опыте допускается использование в каждой из них по 3 экспериментальных животных.

6) в опытах не используют беременных и лактирующих самок, а также зверьков, которые ранее уже участвовали в эксперименте.

7) при выдерживании экспериментальных животных в виварии должны соблюдаться стандартные условия их содержания – постоянные температура (16-23°C) и влажность воздуха (75-80%), оптимальный режим освещенности (естественный или 12/12 часов), животные должны быть обеспечены свежей подстилкой (гнездовым материалом) и питьевой водой;

8) натурные (полупроизводственные) испытания или лабораторное определение (проводится с контролем биологического материала) целевой эффективности зооцидов проводят путем постановки опытов не менее чем в двух, а при получении неудовлетворительного результата в одном из них – не менее чем в трех повторностях с последующей статистической обработкой полученных результатов.

154. Эксперименты по испытанию эффективности отравленных приманок проводят в условиях одиночного содержания зверьков в клетках, как правило, при наличии альтернативного корма. В качестве контрольного корма используют овсяную и перловую крупу или зерно пшеницы. Опытным кормом служит готовая отравленная приманка или приманка, изготовленная из концентрата яда по предложенной рецептуре (при отсутствии рекомендаций по пищевой основе берется перловая крупа).

Вес зверьков определяют в начале и в конце опыта. В течение 7 дней зверькам предлагают контрольный корм в двух одинаковых кормушках, ежедневно меняя их местами и регистрируя количество съеденного корма, добиваясь одинакового его поедания в обеих. После этого корм в одной из кормушек меняют на испытываемую отравленную приманку и продолжают опыт. Время экспозиции отравленной приманки – 5 суток при оценке ядов острого и 14 – при оценке ядов кумулятивного действия (в том числе антикоагулянтов второго поколения). Последующее наблюдение при стандартном рационе питания – 14 суток.

Эффективность средства оценивают процентом погибших зверьков от общего их числа в опыте. Эффективность считается удовлетворительной для ядов острого действия при альтернативном кормлении при 60% и более погибших грызунов, для ядов кумулятивного действия – при гибели не менее 70% зверьков. При этом поедаемость приманки (процент съеденной отравленной приманки от общего количества съеденного корма – отравленного и не отравленного) для ядов острого действия должна быть не менее 5%, для ядов кумулятивного действия – не менее 10%.

155. Оценка эффективности механических средств борьбы с грызунами. Опыты проводят на одиночных зверьках или на группировке особей (всего 6-8 зверьков, самки и самцы поровну). Зверьков содержат в вольере (клетке) с кормом, водой и убежищами, выдерживая до начала эксперимента не менее трех суток. Площадь вольеры (клетки) должна быть достаточной для свободного прохода зверьков к ловчим устройствам. В эксперименте количество одноместных ловчих устройств должно быть равно количеству зверьков в вольере (n), многоместных – от 1 до n. При испытаниях ловчих устройств с приманкой она должна быть стандартной – кусочки хлебной корки размером 1×1 см с подсолнечным маслом.

Продолжительность опыта 2-3 суток при вылове мышей и 5-7 суток при вылове крыс, так как последним в большей мере свойственно явление неophobia, то есть боязни нового. При этом в первые дни опыта ловчие устройства нестораживаются, с клеевых поверхностей защитный слой не снимается. Это делается в последние сутки опыта: показатель эффективности – вылов не менее 50% грызунов за 24 часа.

156. Оценка эффективности ультразвуковых устройств для отпугивания грызунов. Опыты проводят на одиночных зверьках диких форм *R. norvegicus* или *M. musculus* либо на группировке особей этих видов (всего не менее 6 зверьков, самки и самцы поровну). Зверьков содержат в двух сообщающихся между собой вольерах, по возможности расположенных в соседних помещениях. Вольеры, как и условия содержания в них зверьков (корм, вода и убежища), должны быть одинаковы. Площадь вольер не должна превышать площади, защита которой заявлена в документации тестируемого ультразвукового устройства.

Группу грызунов формируют не менее, чем за трое суток до включения испытываемого устройства. Корм из кормушек ежедневно взвешивают, из каждой вольеры порознь. Затем у одного из вольеров или внутри его

размещают ультразвуковое устройство. Опыт длится три дня. Интенсивность и частоту ультразвукового сигнала дважды в день измеряют соответствующими приборами на расстоянии 1 м от источника.

Эффективность отпугивания грызунов оценивается визуально (1 раз в час в дневное время; при этом наблюдатель должен находиться за пределами радиуса действия прибора либо устройство на 1-2 минуты отключается) и по разнице съеденного корма. Удовлетворительной эффективностью отпугивания считается в том случае, если частота появления зверьков и количество съеденного корма в экспериментальном вольере не превышают 20% от аналогичных показателей в контроле.

Глава 9. Оценка токсичности и опасности средств дезинсекции и дератизации.

157. Для проведения испытаний дезсредств разработаны токсикологические показатели опасности, в основу которых положены лимитирующие критерии вредности при потенциально опасных путях поступления в организм. При этом в связи с принципиально разным назначением зооцидов и инсектицидов лимитирующие критерии для них не всегда совпадают. В зависимости от величины нормативных показателей лимитирующих критериев дезсредств регламентируются условия и сфера их применения.

158. Определение уровня лимитирующих критериев для дезсредств должно проводиться с использованием наиболее простых, но относительно точных методов оценки параметров их токсичности и опасности, а также проявлений общетоксических и специфических свойств в соответствии с назначением и режимом применения. При испытаниях жидких концентрированных или сухих растворимых средств должна исследоваться токсичность как основной формы препарата, так и приготовленных рабочих растворов.

159. Целью токсикологических исследований является определение характера и степени воздействия дезсредств на биологические системы организма, в основном, теплокровных животных, а также получение данных о зависимости «эффект-норма расхода» для данного средства. Наличие таких данных позволяет без существенного снижения эффективности того или иного препарата свести опасность для людей при его использовании до минимума. Выбор наиболее информативных методов оценки токсичности дезсредств с точным соблюдением разработанной схемы проведения эксперимента имеет первостепенное значение в решении данной задачи. Условия эксперимента определяются назначением, составом, формой и сферой применения препарата.

160. Методы оценки токсичности разных по назначению дезсредств при выборе сходных параметров оценки безопасности являются однотипными. Каждый из них требует использования группы здоровых животных, содержащихся при соответствующих условиях с воздействием на них градуированных доз исследуемого средства. Для этих целей, как правило, используются основные виды лабораторных животных – крысы, мыши, морские

свинки и кролики. Исследования выполняются на опытных и контрольных группах животных.

161. Выбор животных для токсикологических экспериментов предполагает максимальное сходство моделируемого на них процесса с интоксикацией у человека. Чтобы с большей степенью достоверности экстраполировать на человека данные, полученные в эксперименте на животных, исследования желательнее проводить на нескольких видах половозрелых животных обоего пола (обязательным видом, как правило, являются крысы), при этом, в первую очередь, во внимание принимаются изменения у наиболее чувствительного вида животных. Для опытов в зависимости от цели эксперимента используют статистически достаточные группы (но не менее 8-10 особей для мелких лабораторных животных и не менее 4-6 для крупных – морские свинки, кролики). При отборе животных в эксперимент должен соблюдаться метод случайной выборки. Подопытные животные должны быть одной линии, вида, возраста, пола, весовых характеристик (масса мышей 18-22 г, крыс –180-200 г, морских свинок – 200-300 г, кроликов 2-3 кг). Они должны быть здоровы, что определяется наблюдением в условиях карантина. По завершении исследования все животные, в том числе и контрольные, подлежат патоморфологическим исследованиям. Срок наблюдения после острого воздействия – 2 недели, после подострого и хронического – месяц.

162. Перед экспериментом необходимо снять фоновые данные по основным показателям (нервная система, масса тела, кровь) и отбраковать нестандартных животных. Пищевой рацион должен содержать все необходимые компоненты для их нормальной жизнедеятельности. В виварии необходимо контролировать уровень аммиака, температуру и влажность воздуха. Концентрация аммиака не должна превышать 0,2 мг/м³. В выборе показателей (физиологических, биохимических и морфологических) следует исходить из направленности действия средств.

163. Результаты всех токсикологических экспериментов подлежат статистической обработке общепринятыми в экспериментально-токсикологических исследованиях методами (критерии Стьюдента или Фишера, непараметрические критерии и др.). В трактовке степени вредности препаратов, выявленные изменения учитываются в случае их выхода за рамки колебаний, соответствующих физиологической норме реакции (в 1,5-26 раз в зависимости от вида используемых показателей). Степень опасности для людей испытанных дезсредств оценивают в соответствии с существующим делением химических веществ на четыре класса опасности по ГОСТ 12.1.007-76 (Таблица 10).

Таблица 10. Классификация токсичности и опасности вредных химических веществ (ГОСТ 12.1.007-76).

Наименование показателя	Класс опасности			
	I чрезвычайно опасные	II высоко опасные	III умеренно опасные	IV мало опасные
ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	Менее 0,1	0,1-1,0	1,1-10,0	Более 10,0
Средняя смертельная доза при введении в желудок, мг/кг	Менее 15	15-150	151-5000	Более 5000
Средняя смертельная доза при нанесении на кожу, мг/кг	Менее 100	100-500	501-2500	Более 2500
Средняя смертельная концентрация в воздухе, мг/м ³	Менее 500	500-5000	500-1-50000	Более 50000
Коэффициент возможности ингаляционного отравления	Более 300	300-30	29-3	Менее 3
Зона острого действия	Менее 6,0	6,0-18,0	18,1-54,0	Более 54,0
Зона хронического действия	Более 10,0	10,0-5,0	4,9-2,5	Менее 2,5

164. Острая токсичность дезсредств определяется как вредное действие, проявляющееся в течение короткого периода после однократного введения дозы или многократных доз вещества, вводимых в течение суток. Исследование острой токсичности дезсредств направлено на установление параметров острой токсичности и проявлений общетоксических и специфических эффектов, а также на выявление видовых различий в чувствительности животных. Наиболее важными параметрами острой токсичности средств дератизации и дезинсекции являются средние смертельные дозы (LD₅₀) при введении испытываемого средства в желудок, при его нанесении на кожу, а также в насыщающих концентрациях паров при ингаляции.

165. Определение средней смертельной дозы при введении в желудок (LD₅₀ оральная).

1) Для любого изучаемого средства желательно определение LD₅₀ на двух видах животных. Выбирается 4-5 доз в геометрической прогрессии с шагом в два раза. Максимальная доза – 10 г/кг. Препараты через зонд натошак

вводятся в желудок в чистом виде, в водных и масляных растворах, в индифферентном растворителе, в виде эмульсий или суспензий в крахмале. Максимально вводимый объем в желудок для мышей не должен превышать 0,5-1 мл, для крыс – 5 мл. Кормление животных возобновляется через 3 часа после введения препарата. У животных регистрируют клиническую картину отравления и сроки гибели, при вскрытии описывают макроскопические изменения в органах.

2) При испытаниях приманочных форм родентицидов LD_{50} определяется путем дозированного скармливания средства. Приманка дается животным натошак, так же в 4-5 дозировках, с последующим наблюдением до ее полного поедания. На указанный период обычное кормление животных прекращают. Если приманка поедается не полностью, то проводят учет ее остаточного количества для расчета потребленной дозы.

166. Определение средней смертельной дозы при нанесении на неповрежденную кожу (LD_{50} накожная) проводят на белых крысах или белых мышах обоего пола путем однократного нанесения средства на кожу спины после предварительного удаления волосяного покрова за сутки до опыта. Средства наносят в чистом виде или в разведении в 4-5 дозах, при этом принимают меры, исключающие слизывание препарата и его поступление в организм через органы дыхания. Площадь экспериментального участка кожи на спине крыс 4×4 см, мышей – 2×2 см, экспозиция – 4 часа. У животных регистрируют клинические проявления интоксикации и сроки гибели, при вскрытии описывают макроскопические изменения в органах. Наблюдение за гибелью животных (%) проводят в течение двух недель. Опасность средства оценивается в соответствии с «Классификацией токсичности и опасности вредных химических веществ» (Таблица 1).

167. Определение ингаляционной опасности дезсредств по степени летучести в насыщающих концентрациях их паров проводят в герметичных емкостях (эксикаторы, камеры), где создают условия свободного испарения средств в течение суток. опыты осуществляют на белых мышах или крысах статическим способом из расчета объем воздуха на одно животное в час (1,5 л на мышь и 5 л на крысу). В ходе эксперимента регистрируют клиническую картину отравления и гибель животных. После окончания воздействия животных обследуют с оценкой общетоксических и специфических изменений. Опасность ингаляционного отравления дезсредств характеризуется степенью проявления интоксикации (Таблица 11).

Таблица 11. Классификация химических веществ по степени летучести (C_{20}).

Класс опасности	Степень опасности и выраженность действия
I – чрезвычайно токсично	Насыщающая концентрация вызывает гибель
II – высоко токсично	Насыщающая концентрация вызывает проявления интоксикации, гибель отсутствует

III – умеренно токсично	Насыщающая концентрация вызывает минимальные изменения интегральных показателей у животных (пороговый уровень)
IV – мало токсично	Насыщающая концентрация не оказывает токсического действия

168. Местно-раздражающее действие средств дератизации и дезинсекции на неповрежденные кожные покровы оценивают при однократной аппликации, а педикулицидных и репеллентных средств в виде шампуней, мазей, лосьонов, спреев, наносимых непосредственно на кожу, – при повторных 10-кратных аппликациях. Для этого теста используются животные трех видов (морские свинки, кролики, крысы). Отбираются в эксперимент животные со светлой неповрежденной кожей. Предварительно (за сутки) кожу освобождают от волосяного покрова. Средства наносят открытым способом плотностью 15-20 мг/см². Площадь участка аппликации кролика 8×9 см, морской свинки 4×5 см, крысы 3×4 см. Экспозиция педикулицидных средств – 1 час, репеллентных – 4 часа с последующим удалением остатков. Изменения кожных покровов регистрируют через 1 час, затем через 24 часа вплоть до их нормализации. Степень раздражающего действия средств дератизации и дезинсекции определяется в баллах по «Классификации опасности по выраженности местно-раздражающих эффектов дезинфицирующих средств на коже» (Таблица 12), основанной на выраженности эритемы (Таблица 13) и интенсивности отека кожи (Таблица 14). При этом у педикулицидных и репеллентных средств в режиме применения (10 аппликаций) кожные эффекты должны отсутствовать.

Таблица 12. Классификация опасности по выраженности местно-раздражающих эффектов дезинфицирующих средств на коже.

Выраженность раздражающего действия	Средний суммарный балл выраженности эритемы и величины отека	Классы
Резко выраженное	более 6	I
Выраженное	4,1-6,0	II
Умеренное	2,1-4,0	III
Слабое или	0-2,0	IV

Таблица 13. Классификация интенсивности эритемы кожи.

Интенсивность эритемы (визуально)	Оценка эритемы по линейке С. В. Суворова, баллы
Отсутствие эритемы	0
Слабая (розовый тон)	1
Умеренно выраженная (розово-красный тон)	2
Выраженная (красный тон)	3
Резко выраженная (ярко-красный тон)	4

Таблица 14. Оценка интенсивности отека кожи.

Степень интенсивности отека	Увеличение толщины кожной складки, мм		Оценка отека, баллы
	кролики	морские	
Отсутствие	0	0	0
Слабая	до 0,5	до 0,3	1
Умеренная	0,6-1,0	0,4-0,6	2
Выраженная	1,1-2,0	0,7-1,0	3
Резко	более 2,0	более 1,0	4

169. Местно-раздражающее действие средства при закапывании в глаза оценивают на кроликах или морских свинках. Отмечают выраженность гиперемии и отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза. Результаты обследования в группе животных суммируются и выносятся заключение о степени и характере поражения глаз при действии на него испытуемого средства. Указывается характер конъюнктивита (поверхностный, глубокий), наличие кератита. Раздражающее действие оценивается на основе классификации выраженности раздражающих свойств (Таблица 15) в соответствии с «Классификацией опасности по выраженности раздражающих свойств дезсредств на глаза» (Таблица 16).

Таблица 15. Оценка интенсивности местно-раздражающего действия средства на глаза.

	Покраснение (века) и бульбарная конъюнктивит (не затрагивающая роговицу и радужную оболочку)	Оценка в баллах
А	Состояние сосудов нормальное	0
	Сосуды явно расширены больше нормы	1
	Разлитая гиперемия, отдельные сосуды трудно различимы	2
	Дуффузная, ярко красного цвета гиперемия	3
	Отек век	
Б	Отека нет	0
	Слабый отек (включая мигательную перепонку)	1
	Явный отек и частичное выворачивание века	2
	Отек, веки наполовину закрылись	3
	Отек, веки закрыты более чем наполовину или полностью	4
	Выделения	
В	Выделений нет	0
	Минимальное количество выделений в углу глазной щели	1
	Выделения с увлажнением век и шерсти около век	2
	Выделения с увлажнением век и вокруг глаз	3
Сумма баллов (А+Б+В)		
	Роговица	
	Помутнение – степень плотности (участок наибольшей плотности)	
	Помутнения нет	0

А	Рассеянное или диффузное, детали радужной оболочки видны	1
	Хорошо различимые полупрозрачные участки, детали радужной оболочки слегка замутнены	2
	Участок с замутнением, детали радужной оболочки не видны, размер зрачка едва различим	3
	Непрозрачная, радужная оболочка не видна	4
Площадь поражения роговицы		
Б	Одна четверть (или менее), но более нуля	1
	Более одной четверти, но менее половины	2
	Более половины, но менее трех четвертей	3
	Более трех четвертей, но менее всей площади	4
Сумма баллов (А+Б)		

Таблица 16. Классификация опасности по выраженности раздражающих свойств дезсредств на глаза.

Выраженность раздражающего действия	Средний суммарный балл (конъюнктива (А+Б+В) + роговица (А+Б))	Классы
Резко выраженное	более 11	1
Выраженное	7-10	2
Умеренное	4-6	3
Слабое	1-3	4
Отсутствие	0	5

170. Выраженность кумулятивных свойств средств дератизации оценивают на основании коэффициента кумуляции: отношение величины суммарной дозы яда, вызывающей определенный эффект (чаще смертельный у 50% подопытных животных) при многократном дробном введении, к величине дозы, вызывающей эффект при однократном воздействии.

$$K_{\text{кум}} = \frac{LD_{50}^n}{LD_{50}^1}$$

Изучение кумулятивных свойств новых родентицидов (для антикоагулянтов крови первого и второго поколений, применяемых в этом качестве в настоящее время, кумулятивные свойства давно хорошо изучены) проводится ускоренным методом Лима в течение 24 ± 4 дней при введении в желудок крыс и мышей. Начальная доза составляет $0,1 LD_{50}$ и вводится 4 дня, затем дозу каждый раз увеличивают в 1,5 раза до окончания опыта. Если $K_{\text{кум}} < 1$, это указывает на кумулятивные свойства средства, а если $K_{\text{кум}} > 1$, это свидетельствует о повышении резистентности организма к этому соединению.

Оценка кумулятивных свойств по $K_{\text{кум}}$ проводится по классификации токсичности и опасности родентицидов (Таблица 17). Если у препаратов не удастся получить смертельного эффекта, оценку кумулятивных свойств проводят с введением максимально возможной дозы в течение 10 дней. Показателем кумулятивного эффекта препарата (кроме смертельного) являются клиническая картина отравления и изменения различных физиологических показателей (функциональная кумуляция).

Таблица 17. Классификация токсичности и опасности средств дератизации (действующих веществ и их препаративных форм).

Лимитирующие эффекты	Показатели	Классы опасности				
		I Чрезвычайно опасные		II Высоко опасные	III Умеренно опасные	IV Мало опасные
		A	B			
Острая токсичность (потенциально опасные пути проникновения в организм)	LD ₅₀ при введении в желудок, мг/кг	< 2	2,1-14	15-150	151-5000	> 5000
	TL ₅₀ , сутки	< 1	> 1	> 1	> 1	-
	Антидот	Нет	Есть	Есть	Есть	Есть
	LD ₅₀ при нанесении на кожу, мг/кг	< 100		100-500	501-2500	> 2500
	LC ₅₀ ингаляционно, мг/м ³	< 500		500-5000	5001-50000	> 50000
	C ₂₀ (по степени летучести) для фумигантов	Тяжелое отравление с возможным летальным исходом		Отравление выше порога острого действия	Отравление на уровне порога острого действия	Отсутствие отравления
Избирательная токсичность	LD ₅₀ нецелевых видов K _{ит} = $\frac{\text{LD}_{50}^{\text{н}}}{\text{LD}_{50}^{\text{г}}}$	< 3		3,1-9	9,1-27	> 27
Кумулятивный эффект	K _{кум} = $\frac{\text{LD}_{50}^{\text{н}}}{\text{LD}_{50}^{\text{л}}}$	< 1		1-3	3,1-5	> 5
Стабильность в почве	Время полураспада (T _{1/2}) на нетоксичные компоненты	> 12		6,1-12	1-6	< 1

171.В качестве лимитирующего критерия, отражающего специфику действия инсектицидных средств, используют определение зоны острого биоцидного эффекта, которая характеризует реальную ингаляционную опасность средства в режиме их применения по отношению к норме расхода. Зона острого биоцидного эффекта представляет собой отношение порога

острого действия инсектицида (Lim_{ac}) к уровню этого средства в воздушной среде при применении его в рабочей концентрации и рекомендованной норме расхода. При определении Lim_{ac} эксперимент проводят на крысах или мышах. Для определения Lim_{ac} животных подвергают однократному воздействию средства в статических условиях опыта. Экспозиция при исследовании дустов, растворов, эмульсий, суспензий, карандашей составляет 1 час, для составов наполнителей аэрозольных баллонов 90 минут. Опыты для установления порога острого действия проводят в интервале от рекомендуемой нормы расхода средства, необходимого для получения биоцидного эффекта, и далее с превышением ее в 3; 10 и более раз – до выявления явного воздействия на животных, оцениваемого по набору специфических и интегральных показателей, отражающих основной характер действия индикаторного компонента средства. На основании полученных величин оценивают степень опасности средства по четырехступенчатой классификации (таблица 18).

Таблица 18. Классификация опасности средств дезинсекции.

Класс опасности	Характеристика класса опасности веществ	Зона биоцидного действия		Заключение о возможности и сфере применения препарата
		острого	по дострого	
I	Чрезвычайно опасные	10 <	1 <	Не рекомендуются к применению
II	Высоко опасные	10-30	1-5	Рекомендуются к применению профессиональным контингентом со средствами индивидуальной защиты и регламентированными условиями использования (расход средства, проветривание, влажная уборка) Не разрешены к применению в детских учреждениях, ЛПУ и на предприятиях общественного питания
III	Умеренно опасные	31-100	5, 1-10	Рекомендуются к применению профессиональным контингентом и населением в быту с регламентированными условиями использования (расход средства, проветривание, влажная уборка) в помещениях любого типа
IV	Мало опасные	100 >	10 >	Рекомендуются к использованию как профессиональным контингентом, так и населением в быту без ограничения сфер применения

172. На основе анализа совокупности всех имеющихся данных, в том числе литературных, а также результатов собственных токсикологических исследований принимается решение о возможности использования испытываемого средства в рекомендованном режиме применения. При этом для отклонения от регистрации дезсредств используются следующие критерии:

3) в состав средства не должны входить действующие субстанции, обладающие отдаленными эффектами (мутагенный, канцерогенный, эмбриотропный, гонадотоксический и тератогенный);

4) не подлежат регистрации средства, относящиеся по параметрам острой токсичности к I классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76 (при введении в желудок и нанесении на кожу) и к I классу опасности по классификации химических веществ по степени летучести (C_{20}) при ингаляции в насыщающих концентрациях (пары);

5) не рекомендуются к регистрации средства, обладающие выраженным кожно-резорбтивным или аллергенным действием.

Прошедшие отбор по безопасности дезсредства должны быть рекомендованы к регистрации дифференцированно, в зависимости от установленных параметров их токсичности, для использования в разных сферах применения:

б) медицинская дезинсекция и дератизация, проводимая профессиональным контингентом, с указанием типа разрешенных к обработке объектов (коммунальное хозяйство, жилой сектор, пищевая промышленность и предприятия общественного питания, ЛПУ и детские учреждения);

7) использование в быту и свободная продажа населению.

Глава 10. Заключительные положения.

173. Максимальные сроки проведения предрегистрационных испытаний ДС с момента представления полного пакета документов, образцов препарата и оплаты предстоящей работы регистрантом, с учетом необходимости проведения опытов и контролей в двух-трех проворностях, определяются трехкратной длительностью срока наблюдений при наиболее продолжительном по времени методе изучения их целевой эффективности и/или токсичности.

По итогам дезинфектологической экспертизы оформляется научный отчет и экспертное заключение о возможности государственной регистрации дезинфекционного средства на таможенной территории Союза, содержащее следующие сведения:

- 1) наименование дезинфекционного средства (препаративной формы);
- 2) изготовитель препаративной формы;
- 3) изготовитель действующих веществ дезинфекционного средства;
- 4) токсикологическая характеристика дезинфекционного средства, его рабочих растворов и препаративных форм;

- 5) основные результаты химико-аналитического, биологического контроля, оценки эффективности и безопасности дезинфекционного средства;
- 6) целевое назначение дезинфекционного средства;
- 7) область применения дезинфекционного средства.

174. Заключение должно быть на фирменном бланке организации, проводившей предрегистрационные испытания, подписано всеми исполнителями и утверждено первым руководителем или исполняющим его обязанности.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурделов Л. А., Турегелдиева Д. А., Айкимбаев А. М., Жумадилова З. Б., Кожалова Р. А. О государственной регистрации средств дезинфекции, дезинсекции и дератизации в Казахстане // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2006. – Вып. 1-2 (13-14). – С. 3-7.
2. Васильев Н. С., Лямкина О. Д. Проблемы паровой стерилизации водных растворов. Дезинфекционное дело. - М. - 2005. - № 1.- с. 57-62.
3. Закон Республики Казахстан «Об обеспечении единства измерений» от 7.06.2000 г. №53-ІІ.
4. Лившиц М. М., Сучков Ю. Г. Контроль работы воздушных стерилизаторов. Дезинфекционное дело. - М. - 2005. - № 1.- с. 62-65.
5. Носик Н. Н., Носик Д. Н., Дерябин П. Г., Желтухин С. Л. Вопросы биобезопасности и вирулицидные свойства дезинфицирующих средств. Дезинфекционное дело. - М. - 2006. - № 3.- с. 33-36.
6. Пантелеева Л. Г. Вирулицидная активность катионных поверхностно-активных веществ и дезинфицирующих средств на их основе. Дезинфекционное дело. - М. - 2006. - № 1.- с. 34-38.
7. Пантелеева Л. Г. Состояние и пути совершенствования арсенала дезинфекционных средств для борьбы с вирусными инфекциями. Дезинфекционное дело. - М. - 2006. - № 4. - с. 14-17.
8. Приказ МЗ РК от 30 ИЮНЯ 2010 года № 476 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил и норм «Санитарно-эпидемиологические требования к применению ядовитых веществ (ядов)».
9. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 29 июля 2022 года № ҚР ДСМ-68 «Об утверждении Санитарных правил «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению дезинфекции, дезинсекции и дератизации».
10. Савенко С. М., Васильев Н. С. Термины и определения в области стерилизации медицинских изделий. Дезинфекционное дело. - М. - 2005. - № 4.- С. 40-46.
11. Савенко С. М., Васильев Н. С., Лямкина О. Д. Большие паровые стерилизаторы для стерилизаций изделий медицинского назначения. Дезинфекционное дело. - М. - 2005. - № 2.- с. 33-39.
12. Савенко С. М., Бойко Л. С., Васильев Н. С., Демидов П. А. Производственный контроль паровой стерилизации изделий медицинского назначения в лечебно-профилактических учреждениях. Дезинфекционное дело. - М. - 2005. - № 2.- с. 40-45.
13. Сельникова Е. П., Гренкова Т. А. Эпидемиологические основы дезинфекционной профилактики вирусных инфекций. Дезинфекционное дело. - М. - 2006. - № 3.- с. 41-45.
14. Сердюк А.М., Е.В.Сурмашева, Г.И.Корчак и др. Современные методические подходы к оценке специфической активности дезинфицирующих средств (состояние вопроса в Украине). Дезинфекционное дело № 2-2008, стр. 27-31.

15. ГОСТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76 г.

16. Шандала М. Г. Состояние и перспективы и проблемы разработки и внедрения в практику новых дезинфекционных технологий. Дезинфекционное дело - М. - 2005. - № 4. - С. 17-22.

17. Шандала М.Г. Актуальные задачи научного обеспечения дезинфекционной практики, Дезинфекционное дело № 3-2008, с. 23-26.

18. Шестаков К. А., Кочетов А. Н. Оценка безопасности применения дезинфицирующих средств, содержащих четвертичные аммониевые соединения, в целях дезинфекции кузезов. Дезинфекционное дело. - М. - 2006. - № 4. - с. 26-27.

19. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство Р 4.2. 2643 -10

20. Рекомендация №7.05.005.97 «Рекомендации для предварительной оценки токсичности химических веществ ускоренным методом» у, Сборник ½, РК, с.88-106.

21. Методические указания «Обеззараживание рук медицинских работников и кожных покровов пациентов при оказании медицинской помощи» №3.5.1.3674-20., Москва 2020г.

23. Решение КТС от 28.05.10г. №299. Глава II. Раздел 20. Требования к дезинфицирующим средствам.

24. «Методические рекомендации по выбору химических дезинфицирующих и стерилизующих средств для применения в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность», Москва 2012 г.

25. Методические указания МУ 3.5.1.3674-20 «Обеззараживание рук медицинских работников и кожных покровов пациентов при оказании медицинской помощи» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 14 декабря 2020г.)