Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2435—09

Издание официальное

Москва
2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2435—09

ББК 51.9
М54

М54 **Методы** изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств: Методические указания. —М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—75 с.

ISBN 978—5—7508—0838—0

1. Разработаны: ФГУН «НИИ дезинфектологии» Роспотребнадзора, кафедрой дезинфектологии ММА им. И. М. Сеченова (М. Г. Шандала, Н. Ф. Соколова, И. М. Абрамова, Л. С. Федорова, А. П. Степнов); Филиалом ФГУ 48 ЦНИИ МО России – Центром военно-технических проблем биологической защиты (В. В. Каницев); ВНИИ железнодорожной гигиены (В. А. Полякова); Испытательным лабораторным центром «Московский городской центр дезинфекции» (Ю. Г. Сучков, Р. Л. Гутерман); ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (В. Н. Андрус); Роспотребнадзором (Л. С. Бойко).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 июля 2008 г. № 2).

3. Утверждены и введены в действие постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 января 2009 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

© **Роспотребнадзор, 2009**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

Содержание

1. Область применения 4

2. Общие положения 4

3. Тест-микроорганизмы для изучения спороцидной активности ДС, СС и субстанций 6

4. Обеспечение стандартности условий проведения исследований спороцидной активности ДС, СС и их субстанций 21

5. Методы исследований и оценки результатов спороцидной активности ДС, СС и их субстанций *in vitro* 24

6. Методы исследования спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме 33

7. Методы исследования и оценки спороцидной активности ДС при использовании в качестве тест-микроорганизма вирулентных штаммов *B. anthracis* 53

8. Методы исследования и оценки спороцидной эффективности СС, предназначенных для стерилизации ИМН, включая эндоскопы 55

9. Метод исследования и оценки спороцидной эффективности СС, предназначенных для ДВУ эндоскопов 60

10. Оценка результатов исследования спороцидной активности и эффективности дезинфицирующих, стерилизующих средств и их субстанций 62

11. Нормативные ссылки 63

12. Библиографические данные 64

Приложение 1. Характеристика тест-микроорганизмов по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, присущим данному виду 67

Приложение 2. Методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микроорганизмов, предназначенных для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций 71

Приложение 3. Материалы и оборудование, необходимые для проведения исследований суспензии спор тест-микроорганизмов 74

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 января 2009 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2435—09

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают общие требования к методологии и оценке спороцидной активности дезинфицирующих средств (ДС), стерилизующих средств (СС) и их субстанций (действующих веществ – ДВ), эффективности ДС при обеззараживании различных объектов внешней среды и СС при стерилизации изделий медицинского назначения.

1.2. Настоящие методические указания предназначены для организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы другими организациями.

1.3. Методические указания разработаны на основе Федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» [1], Федерального закона «Об охране окружающей среды» [2], «Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании» [3], нормативно-методических документов, регламентирующих изучение и критерии оценки активности ДС, СС, а также активности их субстанций.

2. Общие положения

Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» [1] и Федеральный закон «Об охране окружающей среды» [2] регламентируют проведение специфической и неспецифической профилактики инфекционных заболеваний.

В комплекс неспецифических профилактических мероприятий входят дезинфекция и стерилизация [4, 5] с использованием ДС и СС, обладающих спороцидной активностью, т. е. убивающих споры микроорганизмов при регламентированных параметрах технологии (режимах обработки) [6].

ДС, обладающие спороцидной активностью, необходимы для обеззараживания различных объектов при сибирской язве, газовой гангрене, столбняке, дезинфекции высокого уровня (ДВУ) эндоскопов; стерилизующие средства – для стерилизации изделий медицинского назначения (ИМН), включая эндоскопы, и для ДВУ эндоскопов [7—11].

Данные методические указания регламентируют методологию и технологию изучения и оценки спороцидной активности субстанций для производства ДС и СС, спороцидной активности и эффективности химических и физических ДС для обеззараживания различных объектов, а также СС для стерилизации ИМН, обсемененных наиболее устойчивыми микроорганизмами в споровой форме с учетом максимально возможного уровня контаминации ими объектов [10].

Исследования спороцидной активности субстанций, ДС, СС и эффективности режимов их применения включают:

- выбор и подготовку тест-микроорганизмов в споровой форме для изучения спороцидной активности ДС, СС и их субстанций;
- обеспечение стандартности условий проведения исследований спороцидной активности ДС, СС и их субстанций;
- методы исследований и оценку результатов спороцидной активности ДС, СС и их субстанций *in vitro* (суспензионный метод, метод батистовых тест-объектов) и спектра спороцидной активности;
- методы исследований и оценку спороцидной эффективности ДС при разработке режимов обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме;
- методы исследований спороцидной эффективности СС при разработке режимов стерилизации ИМН, включая эндоскопы;
- методы исследований спороцидной активности СС, предназначенных для ДВУ эндоскопов.

Для применения спороцидных ДС в очагах искусственного происхождения (биотерроризм) разработанные режимы (дезинфектологические технологии) должны корректироваться в специальных лабораториях, изучающих возможные споровые биологические рецептуры и связанные с этим специфические особенности дезинфекции в очагах заражения.

Организации, проводящие исследования спороцидной активности и эффективности химических ДС, СС и их субстанций, в от-

четной документации, представляемой для регистрации и сертификации средств, должны представлять конкретные результаты оценки стандартности использованных в исследованиях спор тест-микроорганизмов, а также эффективности нейтрализации ДВ использованного нейтрализатора.

3. Тест-микроорганизмы для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций

При изучении спороцидной активности ДС и их субстанций в качестве тест-микроорганизмов используют:

- *Bacillus cereus*, шт. 96;
- *Bacillus subtilis*, шт. 7;
- сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей;
- *Bacillus anthracis*, шт. 81/1 (pX01$^+$, pX02$^+$), или шт. 27 (pX01$^+$, pX02$^+$).

При изучении спороцидной активности СС и их субстанций в качестве тест-микроорганизмов используют:

- *Bacillus cereus*, шт. 96;
- *Bacillus subtilis*, шт. 7;
- *Bacillus licheniformis*, шт. G ВКМ В-1711D;
- *Geobacillis stearothermophilis*, шт. ВКМ В-718.

Тест-микроорганизмы выбирают в зависимости от действующего вещества (ДВ) и от назначения спороцидного ДС, СС и его субстанции.

3.1. Требования к тест-микроорганизмам

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические свойства, присущие данному виду (прилож. 1), и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС и СС [10]: хлорамину 10 %, перекиси водорода 6 %, глутаровому альдегиду 2,5 % (pH 7,2), сухому горячему воздуху при (160 ± 3) °С, водяному текучему пару при 100 °С, водяному насыщенному пару под избыточным давлением при (121 ± 1) °С.

Показатели устойчивости тест-микроорганизмов к вышеперечисленным средствам приведены в табл. 1.

Музейные штаммы тест-микроорганизмов хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С в виде сухой культуры в ампулах (после лиофильной сушки) не более двух лет [13].

Тест-микроорганизмы, не обладающие указанной устойчивостью, подлежат замене.

Спороцидную активность ДС, СС и их субстанций определяют, используя тест-микроорганизмы в споровой форме [12].

Таблица 1

Устойчивость спор тест-микроорганизмов к эталонным дезинфицирующим и стерилизующим средствам

Тест-культура		Время гибели тест-микроорганизмов, не менее (мин), при действии					
название и штамм	количество спор в тест-объекте	хлорамина 10 %	перекиси водорода 6 %	глутарового альдегида 2,5 %	сухого горячего воздуха (160 ± 3) °С	водяного текучего пара (100 °С)	водяного насыщенного пара под избыточным давлением (121 ± 1) °С
Тест-микроорганизмы для изучения и оценки дезинфицирующих средств и их субстанций							
Bacillus cereus, шт. 96	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	60	–	6—7	–
Bacillus subtilis, шт. 7	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	180	–	6—7	–
Сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	60	–	6—7	–
Bacillus anthracis, шт. 81/1 или 27	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	60	–	6—7	–
Тест-микроорганизмы для изучения и оценки стерилизующих средств и их субстанций							
Bacillus cereus, шт. 96	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	60	–	6—7	–
Bacillus subtilis, шт. 7	$(1–5) \cdot 10^6$	360	60	180	–	6—7	–
Bacillus licheniformis G BKM B-1711D	$(1–5) \cdot 10^6$	–	–	–	30	–	–
Geobacillis stearothermophilis, шт. BKM B-718	$(1–5) \cdot 10^6$	–	–	–	–	–	15

Дальнейшие исследования проводят с использованием наиболее устойчивого к проверяемому ДС тест-микроорганизма.

3.2. Методика приготовления суспензии спор тест-микроорганизмов

Для получения тест-микроорганизмов в споровой форме их выращивают на питательных средах, приведенных в табл. 2.

Таблица 2

Питательные среды для выращивания тест-микроорганизмов в споровой форме

№ п/п	Тест-культуры	Питательные среды
1	Bacillus cereus, шт. 96	Пшеничный агар
2	Bacillus subtilis, шт. 7	
3	Bacillus anthracis, шт. 81/1, 27	Пшеничный агар или агар Хоттингера с аминным азотом 120 мг %
4	Bacillus licheniformis, G BKM B-1711D	Пшеничный агар или картофельно-пептонный агар
5	Geobacillis stearothermophilis, шт. BKM B-718	

Перечень компонентов и методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микроорганизмов, предназначенных для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций, приведены в прилож. 2.

Процесс приготовления суспензии спор тест-микроорганизма, используемого при исследовании и оценке спороцидной активности ДС, СС и их субстанций, включает три последовательных этапа:

- получение бульонной культуры из музейной лиофилизированной или агаровой культуры тест-микроорганизма;
- получение споровой агаровой культуры тест-микроорганизма;
- приготовление суспензии спор тест-микроорганизма и оценка соответствия ее требованиям.

При использовании лиофилизированной споровой культуры ампулы с этой культурой вскрывают в асептических условиях следующим образом: тампоном ваты, смоченным этиловым спиртом, обрабатывают поверхность ампулы, затем нагревают ее запаянный конец над пламенем. К накаленному концу ампулы прикладывают ватную пробку, смоченную стерильной водой, чтобы на ампуле образовалась трещина. Металлическим инструментом (скальпель,

пинцет) откалывают по трещине конец ампулы. После этого стерильной пастеровской пипеткой в ампулу вливают 0,2 мл стерильной питьевой воды и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Для получения суспензии спор содержимое ампулы перемешивают с помощью стерильной бактериологической петли.

Полученную таким образом в ампуле суспензию спор тест-микроорганизма отсасывают стерильной пастеровской пипеткой и переносят по 1—2 капли в две пробирки с 5 мл питательного бульона (бульон Хоттингера, сухой питательный бульон – СПБ, мясо-пептонный бульон МПБ), содержащего 0,5 % глюкозы.

При работе с возбудителем сибирской язвы для приготовления суспензии спор ампулы с высушенными культурами вскрывают в помещении музея (коллекции) живых культур. Манипуляции проводят в боксе биологической безопасности. При этом оттянутый конец ампулы нагревают над пламенем газовой горелки; затем влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором и хорошо отжатой, и обламывают пинцетом.

После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1—2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезинфицирующий раствор. Вскрытую ампулу накрывают стерильным марлевым тампоном на 1—2 мин. Затем в ампулу вносят 0,2 мл стерильной питьевой воды для приготовления суспензии спор, которую далее высевают в жидкие питательные среды, как указано выше.

Посевы *G. stearothermophilis* инкубируют при температуре (55 ± 1) °С, а *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis* и *B. licheniformis* – при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

Бульонные культуры тест-микроорганизмов бактериологической петлей или пастеровской пипеткой (по 1—2 капли) пересевают в пробирки на скошенную питательную среду (сухой питательный агар – СПА, мясо-пептонный агар – МПА). Посевы инкубируют в течение 24—48 ч, как указано выше.

Для получения спор культур *B. licheniformis*, *G. stearothermophilis* в пробирки с посевом необходимого для проведения исследования тест-микроорганизма добавляют 5 мл стерильной дистиллированной воды и смывают культутру, выросшую на твердой питательной среде. Полученную взвесь переносят во флаконы или емкости до 250/500 мл, содержащие соответственно 100/200 мл соответствующего для данного тест-микроорганизма скошенной твердой (агаровой) питательной среды (табл. 2).

На поверхность питательной среды в каждый флакон (матрац), в зависимости от их вместимости (250/500 мл), вносят суспензию, смытую с 1—2 пробирок с посевами. Взвесь покачиванием флакона (матраца) равномерно распределяют по поверхности среды, закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками и инкубируют при температуре (55 ± 1) °С (*G. stearothermophilus*) или (37 ± 1) °С (*B. licheniformis*) в течение 10—12 сут. в наклонном положении (под углом 45 °С) агаром вверх. Для создания достаточной влажности в термостат, работающий при температуре (55 ± 1) °С, помещают открытые емкости с водой (до 2 л на термостат вместимостью 80 л).

Тест-микроорганизмы *B. cereus*, *B. subtilis* и *B. anthracis* для получения споровой формы засевают на скошенный пшеничный агар или агар Хоттингера с аминным азотом 120 мг % и выращивают при температуре (37 ± 1) °С двое суток в термостате, а затем еще 7—12 суток при температуре (20 ± 1) °С в темном месте. На 7 и 9 сут. культуры проверяют на интенсивность спорообразования. Для этого выборочно из 2—3 флаконов (матрацев) культуру забирают петлей с верхнего, среднего и нижнего участков агара; все три пробы растирают вместе на одном предметном стекле, распределяя тонким слоем. Мазок фиксируют над пламенем горелки, окрашивают по Граму или генцианвиолетом (по Синеву). Окрашенные препараты промывают питьевой водой, подсушивают и микроскопируют с иммерсионной системой – споры имеют вид неокрашенных пустот, находящихся внутри клеток.

При работе с *B. anthracis* для фиксации мазков используют 90°-й этиловый спирт или смесь Никифорова (равное количество спирта и эфира), время фиксации 30 мин. Затем мазок окрашивают при нагревании 1—2 мин карболовым фуксином Циля, промывают водой и обесцвечивают, погружая в 2 %-й раствор азотной кислоты в спирте или в 1 %-й раствор серной кислоты, так чтобы на препарате не было видно следов красителя. После этого мазок промывают водой и докрашивают водным раствором метиленового синего. Допустима окраска по Ожешко. При окраске *B. anthracis* карболовым фуксином споры окрашиваются в красный цвет.

Исследуют 10 полей зрения, подсчитывают количество спор, выражая в процентах. Достаточным количеством считают не менее 90 % спор в поле зрения от общего числа клеток.

После завершения спорообразования культуру осторожно при помощи шпателя (из проволоки) или стерильных стеклянных бус смывают с поверхности агара 5—10 мл стерильной дистиллированной воды (в зависимости от вместимости флакона) и сливают в емкости (пробирки, флаконы), которые закрывают стерильными резиновыми пробками.

Для оценки качества полученной споровой суспензии тест-микроорганизма и принятия решения о возможности использования ее по назначению, из флакона (после тщательного перемешивания путем встряхивания) стерильно отбирают в пробирку 10 мл суспензии и определяют соответствие требованиям по биологической концентрации (БК) спор в суспензии и их устойчивости к эталонным физическим и химическим агентам, представленным в табл. 1.

3.3. Определение биологической концентрации тест-микроорганизма в споровой суспензии

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

Для проведения испытания необходимы материалы и оборудование, приведенные в прилож. 3.

При выполнении испытания соблюдают следующие условия:

- используют дозаторы пипеточные не менее 2-го класса точности;
- в процессе выполнения опыта соблюдают асептические условия;
- контролируют температуру термостата и срок инкубации посевов.

До проведения испытания выполняют следующие подготовительные операции:

- расплавляют на кипящей водной бане плотную питательную среду (агар) и охлаждают ее до температуры (45 ± 5) °С;
- охлажденную питательную среду разливают по (25 ± 5) см³ в стерильные чашки Петри в пламени спиртовки (газовой горелки) и оставляют чашки на горизонтальной поверхности, пока не застынет агар;
- при необходимости подсушивают чашки с плотной питательной средой в термостате крышками вниз;
- разливают в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками по 4,5 см³ стерильной дистиллированной воды.

В работе используют только кондиционные партии питательных сред, для чего предварительно проверяют их качество путем высева эталонной культуры соответствующего штамма. Для кон-

диционной среды число выросших тест-микроорганизмов от их общего количества должно составлять не менее 50 %.

При определении БК тест-микроорганизма в исходной суспензии спор агаровой культуры, последнюю разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации, соответствующей по бактериальному стандарту мутности 1 млрд микробных тел в 1 мл. Затем стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл суспензии спор и переносят в пробирку, содержащую 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученное разведение (10^{-1}) тщательно встряхивают. Аналогично, меняя пипетку, делают все последующие разведения до необходимого (10^{-6}), теоретически соответствующего концентрации $1 \cdot 10^3$ спор в 1 мл. Из двух последовательных десятикратных разведений исходной суспензии производят высев по 0,1 мл на поверхность трех чашек Петри с агаром (агар Хоттингера, СПА, МПА). Чашки Петри инкубируют при температуре (55 ± 1) °С или (37 ± 1) °С в зависимости от вида культуры в течение 24—48 ч, после чего определяют число КОЕ. Количество жизнеспособных спор в исходной суспензии определяют как среднее арифметической число КОЕ с учетом разведения исходной суспензии и объема пробы для посева.

Пример расчетов. Предположим, что при посеве на три чашки Петри с агаром суспензии в разведении 1 : 100 000 подсчитано 140, 110 и 134 КОЕ. Аналогичные высевы из разведений 1 : 1 000 000 привели к образованию 12, 14 и 16 КОЕ.

Вычисляем общее число КОЕ, найденных во всех трех чашках Петри соответствующих разведений:

1 : 100 000 — 140 + 110 + 134 = 38,4;

1 : 1 000 000 — 12 + 14 + 16 = 42.

Среднее число КОЕ на чашках составит для разведения:

1 : 100 000 — 384 : 3 = 128;

1 : 1 000 000 — 42 : 3 = 14.

Из расчета посевной дозы (0,1 мл на каждую чашку) вычисляем число жизнеспособных спор в 1 мл исходной суспензии с учетом разведений, далее находим среднее арифметическое числа КОЕ:

$$128 \cdot 10 \cdot 10^5 = 12{,}8 \cdot 10^7,$$
$$14 \cdot 10 \cdot 10^6 = 14{,}0 \cdot 10^7.$$

Таким образом, число жизнеспособных спор в исходной суспензии составит:

$$(12{,}8 + 14{,}0) \cdot 10^7 : 2 = 13{,}4 \cdot 10^7 = 1{,}32 \cdot 10^8 \text{ спор/мл}.$$

Или при посеве из одного последнего разведения по 0,1 мл на 5 чашек Петри расчет концентрации жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл суспензии препарата осуществляют по формуле:

$$БК = x \cdot p \cdot 2, \text{ где}$$

БК – концентрация жизнеспособных спор тест-микроорганизма, КОЕ · мл;
x – суммарное количество колоний, выросших на пяти чашках, КОЕ;
p – разведения;
2 – коэффициент, приводящий измерение объема посеянной суспензии к 1 мл.

Например: общее количество колоний на 5 чашках Петри составило 540 КОЕ, тогда количество жизнеспособных спор в исходной суспензии равно:

$$БК = 540 \cdot 2 \cdot 10^6 = 1080 \cdot 10^6 = 1{,}08 \cdot 10^9 \text{ спор/мл.}$$

Герметично закрытые стерильной пробкой флаконы (пробирки) с исходной суспензией спор хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С до 6 мес., если споры тест-микроорганизма соответствуют вышеуказанным требованиям (табл. 1). Для снижения негативного влияния на суспензию спор перепада температуры, неизбежного при извлечении флакона из холодильника для отбора части суспензии, необходимой для проведения исследования ДС, СС и их субстанций, суспензию спор тест-микроорганизма из флакона целесообразно расфасовывать в пробирки и использовать их по мере необходимости.

Чистоту культуры тест-микроорганизма на всех этапах культивирования контролируют путем посева ее на чашки Петри с агаром Хоттингера, СПА, МПА.

Сибиреязвенную живую сухую вакцину (СТИ-1) при изучении спороцидной активности и эффективности используют в виде суспензии, содержащей 10^8—10^9 спор/мл, приготовленной разбавлением содержимого одной ампулы в 10 мл стерильной питьевой воды.

3.4. Методики определения устойчивости спор тест-микроорганизмов к эталонным ДС

3.4.1. Определение устойчивости спор к текучему пару, водяному насыщенному пару под избыточным давлением, сухому горячему воздуху

Устойчивость к действию текучего пара спор *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, сибиреязвенной вакцины СТИ-1 определяют в аппарате Ойль-Мюллера, используя батистовые тест-объекты, контаминированные вышеуказанными тест-микроорганизмами, с последующим посевом тест-объектов в жидкую питательную среду.

Аппарат Ойль-Мюллера может быть заменен устройством, доступным для изготовления практически в любой лаборатории, где необходимо провести такое исследование. Для этого берется стеклянная колба объемом 1—2 л с широким удлиненным горлом. Корковую пробку под него срезают на $^1/_3$ по длине для обеспечения выхода пара. Это отверстие используется и для проведения измерения термометром температуры пара в месте размещения батистовых тест-объектов. Через трубку пропускают проволоку, имеющую на конце припаянную (или укрепленную другим способом) перпендикулярно к ней металлическую сеточку диаметром 3—3,5 см из нержавеющей стали, предназначенную для размещения батистовых тест-объектов, контаминированных спорами тест-микроорганизма.

Проволоку в пробке устанавливают так, чтобы сеточка находилась в месте перехода конуса колбы в горло. Это обеспечивает прохождение через сеточку практически всего объема выделяемого кипящей в колбе водой пара. Уровень воды должен находиться от сеточки на расстоянии 5—6 см.

В процессе испытаний контролируют следующие показатели:

- температуру текучего пара;
- исходную и остаточную контаминацию батистовых тест-объектов;
- время действия пара на контаминированные тест-объекты в аппарате Ойль-Мюллера (колбе).

Исследования проводят следующим образом: в колбу наливают дистиллированную воду и нагревают ее до кипения. При достижении температуры 100 °С на термометре, находящемся под воздействием текучего пара, на предварительно простерилизованную автоклавированием вместе с пробкой или обожженную в пламени сеточку помещают 2 батистовых тест-объекта (1 × 0,5 см), контаминированных спорами тест-микроорганизма (методику приготовления тест-объектов см. в п. 5.2). Тест-объекты размещают так, чтобы исключался контакт их со стенкой горла колбы при введении сеточки в колбу. Держась за пробку, сеточку с тест-объектами вносят в зону действия текучего пара и включают секундомер. По истечении 2 мин воздействия пара, держась за пробку, сеточку с тест-объектами извлекают из колбы, а тест-объекты сразу помещают (засевают) в две пробирки со стерильным питательным бульоном. Обжигают сеточку и кладут на нее 2 новых тест-объекта. Аналогично вышеописанному вносят их в зону действия пара на 2 мин, затем также извлекают и помещают в пробирки со стерильным питательным бульоном. Так операцию повторяют, увеличивая экспозицию на 1 мин до 10 мин. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в те-

чение 7 сут. Предварительный учет результатов проводят через 48 ч инкубирования, окончательный – на 7 сут. Из проросших пробирок с бульоном делают посев петлей на твердую среду для идентификации выросших тест-микроорганизмов.

При использовании аппарата Ойль-Мюллера необходимо не допускать случайного прикосновения к горлышку колбы сначала до обеззараживания тест-объектов, затем – после обеззараживания. Этих погрешностей, искажающих результаты опыта, можно избежать при использовании аппарата Ойль-Мюллера в модификации Л. А. Блиновой (рис. 1). В емкости для текучего пара имеется четыре отверстия. Первое отверстие (1) размещается вверху и предназначено для термометра, второе (2) справа в торце – для внесения зараженных тест-объектов, третье (3) – на лицевой стороне – для изъятия обеззараженных тест-объектов и четвертое (4) – слева в торце для выхода пара. При пользовании таким аппаратом тест-объекты накалывают на иглу, закрепленную в пробке, которую вставляют в отверстие 2. Отверстие 3 во время экспозиции закрыто стерильной пробкой. По окончании экспозиции его открывают и через него извлекают обожженным пинцетом снятые с иглы тест-объекты, которые сразу засевают в бульон.

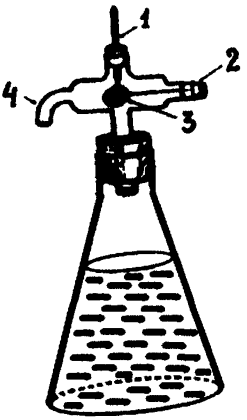

Рис. 1. Принципиальная схема устройства аппарата Ойль-Мюллера в модификации Л. А. Блиновой

Применяемый в аппарате термометр должен иметь шкалу с делениями на десятые доли градуса. Определение устойчивости спор бацилл к текучему пару проводят при атмосферном давлении близком к 760 мм рт. ст. Учет этого фактора важен, поскольку существенно может влиять на результаты оценки. Так, при атмосферном давлении 745 мм рт. ст. температура текучего пара составляет 99,4 °С и резистентность при этой температуре *B. cereus* равна 6—7 мин, а при давлении 765 мм рт. ст. температура пара – 100,8 °С резистентность не превышает 3—4 мин.

Споры тест-микроорганизмов должны иметь устойчивость к текучему пару температурой 100 °С не менее 7—9 мин.

Устойчивость тест-микроорганизма *G. stearothermophilus* к водяному насыщенному пару под избыточным давлением.

В качестве тест-носителя применяют флаконы из нейтрального стекла, контаминированные суспензией спор тест-микроорганизма *G. stearothermophilus*.

Предварительно флаконы тщательно моют и стерилизуют паровым или воздушным методом. Из исходной суспензии спор готовят рабочую суспензию для контаминации тест-носителей.

Стерильные тест-носители контаминируют из расчета $(1—5) \cdot 10^6$ тест-микроорганизма *G. stearothermophilus*, что достигается внесением в каждый носитель с помощью дозатора пипеточного 0,02 мл суспензии спор с содержанием от $5 \cdot 10^7$ до $2,5 \cdot 10^8$ спор/мл.

Контаминированные тест-носители высушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч и закладывают в бумажные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов в Российской Федерации.

Устойчивость спор тест-микроорганизма *G. stearothermophilus* к водяному насыщенному пару под избыточным давлением определяют в паровом стерилизаторе объемом 75 $дм^3$ с гравитационным способом предварительного удаления воздуха из стерилизационной камеры.

Упакованные тест-носители помещают в стерилизационной коробке в незагруженную камеру парового стерилизатора. После набора давления в водопаровой камере (1,1 ± 0,1) $кгс/см^2$ проводят вытеснение воздуха паром из камеры парового стерилизатора (продувка парового стерилизатора) в течение 10 мин (при открытом спускном кране и давлении в стерилизационной камере от 0,1 до 0,2 $кгс/см^2$). После продувки доводят давление пара в стерилизационной камере до 1,1 ± 0,1 $кгс/см^2$ (121 ± 1) °С и через 5 мин (время выживания спор тест-микроорганизма) с момента установления давления спускают пар. Для уменьшения времени воздействия пара до и после периода испытуемого воздействия (время воздействия при температуре (121 ± 1) °С) подъем давления проводят максимум в течение 8 мин, спуск – в течение 3 мин. Контроль температуры осуществляют максимальными термометрами (СП-82).

Аналогичное исследование проводят с 15-минутным временем воздействия (время гибели спор тест-микроорганизма). При каждом из указанных периодов воздействия экспонируют не менее 10 тест-носителей. По окончании времени выдержки тест-носители вынимают из стерилизатора. Во флаконы вносят 1 мл питательной среды (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ, цветная питательная среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым), закрывают стерильными резиновыми пробками (N 7,5) и инкубируют при

температуре (55 ± 1) °С в течение 7 сут. при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ) или в течение 48 ч при использовании цветной питательной среды с индикатором бромкрезоловым пурпуровым.

Учет результатов проводят путем визуального осмотра. Отсутствие помутнения/изменения цвета питательной среды с индикатором указывает на гибель спор. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение последних с тест-микроорганизмом.

В качестве контроля используют тест-носители, которые не подвергали действию стерилизующего средства. Посевы контрольных тест-носителей и питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляют аналогично опытным тест-носителям, которые подвергали действию стерилизующего средства.

Время гибели спор *G. stearothermophilus* при действии водяного насыщенного пара под избыточным давлением (1,1 ± 0,1) кгс/см², температуре (121 ± 1) °С должно быть не менее 15 мин.

Устойчивость спор *B. licheniformis* к сухому горячему воздуху определяют в воздушном стерилизаторе объемом 80 дм³ с принудительной циркуляцией и скоростью движения воздуха более 1 м/с, которые обеспечивают допустимые предельные отклонения от номинального значения температуры.

В качестве тест-носителя применяют флаконы из нейтрального стекла, контаминированные спорами тест-микроорганизма *B. licheniformis*. Предварительно флаконы тщательно моют и стерилизуют паровым или воздушным методом. Из исходной суспензии спор готовят рабочую суспензию для контаминации тест-носителей из расчета (1—5) · 10^6 спор в носителе.

Стерильные тест-носители контаминируют рабочей суспензией спор тест-микроорганизма *B. licheniformis*, что достигается внесением в каждый тест-носитель с помощью дозатора пипеточного 0,02 мл суспензии спор в дистиллированной воде с содержанием от 5,0 · 10^7 до 2,5 · 10^8 спор/мл.

Контаминированные тест-носители высушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч и закладывают в бумажные или полимерные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов в Российской Федерации.

Упакованные тест-носители помещают на полку воздушного стерилизатора, предварительно прогретого до 140 °С. Стерилизатор закрывают и после достижения температуры (160 ± 3) °С начинают отсчет времени выдержки. Через 4 мин (время выживания спор тест-микроорганизма) аппарат отключают. Контроль температуры осуществляют по наружному термометру.

Аналогичное исследование проводят с 30-минутным временем испытуемого воздействия (время гибели спор тест-микроорганизма). При каждом из указанных периодов испытуемого воздействия экспонируют не менее 10 тест-носителей.

По окончании времени выдержки тест-носители вынимают из стерилизатора. Во флаконы вносят 1 мл питательной среды (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ, цветная питательная среда с индикатором бромтимоловым синим) и закрывают стерильными резиновыми пробками (N 7,5) и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 7 сут. при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ) или в течение 48 ч при использовании цветной питательной среды с индикатором бромтимоловым синим.

Учет результатов опытов и контроля проводят также как при определении устойчивости спор к водяному насыщенному пару под давлением.

Время гибели спор тест-микроорганизма *B. licheniformis* при действии сухого горячего воздуха при температуре (160 ± 3) °С должно быть не менее 30 мин.

3.4.2. Определение устойчивости спор к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду

Устойчивость к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду у спор *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, живой сухой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 определяют методом погружения батистовых тест-объектов, контаминированных споровой суспензией указанных культур (п. 6.2) в 10 %-й раствор хлорамина, 6 %-й раствор перекиси водорода, 2,5 %-й раствор глутарового альдегида с последующей нейтрализацией действующих веществ и посевом в жидкую питательную среду.

В процессе испытаний контролируют концентрацию действующего вещества в рабочем растворе ДС, температуру его в опыте, исходный и остаточный уровень контаминации спорами тест-объекта КОЕ, время выдержки тест-объектов в испытуемом дезинфицирующем растворе.

Определения устойчивости спор к хлорамину. Йодометрическим методом определяют процент активного хлора в хлорамине. В опытах используют препарат, содержащий 26—28 % активного хлора, растворяя который в воде готовят 10 %-й (по препарату) рабочий раствор. Готовят и разливают в пробирки по 5 мл стерильный раствор нейтрализатора (2 %-й раствор тиосульфата натрия), стерильную питьевую воду, питательный бульон (МПБ). Готовят и контаминируют тест-микроорганизмом батистовые тест-объекты (п. 5.2). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные спорами тест-микро-

организма тест-объекты, то их заранее извлекают из холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18—20 °С).

При проведении экспериментов в стеклянную емкость объемом 50—100 мл пипеткой наливают требуемый объем 10 %-го раствора хлорамина, из расчета 0,5 мл на каждый тест-объект и помещают в водяную баню с температурой 20 °С на весь период опыта. Отсчитывают в чашке Петри необходимое для опыта количество контаминированных спорами тест-микроорганизмов батистовых тест-объектов (по 2 на каждую экспозицию), захватывают их стерильным пинцетом все сразу и опускают в емкость с раствором хлорамина; легким покачиванием емкости добиваются полного их смачивания. В момент смачивания всех тест-объектов отмечают время.

Через каждый час стерильной петлей извлекают по 2 тест-объекта из раствора хлорамина и опускают их в пробирку с 5 мл 2 %-го стерильного раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточного действия хлорамина. Через 5—10 мин тест-объекты переносят во вторую пробирку с 5 мл стерильной питьевой воды, а через 10—15 мин каждый тест-объект помещают в 5 мл питательного бульона.

Для контроля два контаминированных спорами тест-микроорганизма тест-объекта погружают в стерильную воду (вместо раствора хлорамина) на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их переносят последовательно в раствор нейтрализатора (тиосульфат натрия), стерильную питьевую воду и сеят в жидкий питательный бульон в пробирках. Полноту нейтрализации активного хлора контролируют путем погружения неконтаминированных тест-объектов в раствор 10 % хлорамина на максимальную экспозицию, затем в раствор тиосульфата натрия, промывают в воде и помещают в бульон, куда вносят 0,1 мл суспензии, содержащей 20—30 жизнеспособных спор тест-микроорганизма. Рост культуры в бульоне свидетельствует об эффективной нейтрализации действия хлорамина.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре (37 ± 1) °С; наличие роста тест-микроорганизма проверяют через 48 ч. Из пробирок с ростом делают посев петлей на твердую питательную среду для идентификации тест-микроорганизмов. Окончательный учет результатов проводят через 7 сут.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Споры тест-микроорганизмов: *B. cereus* (шт. 96), *B. subtilis* (шт. 7), *B. anthracis* (шт. 81/1 и 27), живой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 должны быть устойчивы к 10 %-му раствору хлорамина не менее 360 мин.

Определение устойчивости спор к перекиси водорода. Иодометрическим методом определяют концентрацию перекиси водорода в средстве «Перекись водорода медицинская». В опытах использу-

ют средство, содержащее не менее 30 % перекиси водорода, из которого путем разведения стерильной питьевой водой готовят раствор для исследований, содержащий 6 % перекиси водорода. Для нейтрализации перекиси водорода используют стерильный 2,5 %-й раствор тиосульфата натрия. Подготовку и определение устойчивости спор тест-микроорганизмов к 6 %-му раствору перекиси водорода проводят по такой же методике, как и к хлорамину, только в качестве нейтрализатора используют 2,5 %-й раствор тиосульфата натрия. Учитывая, что споры тест-микроорганизмов должны быть устойчивы к воздействию 6 %-го раствора перекиси водорода в течении не менее 60 мин, испытание осуществляют в течение 90 мин с отбором проб (по 2 теста) через каждые 15 мин (обычно берут по 2 тест-объекта на 6 экспозиций). Аналогично, как и при определении устойчивости спор к хлорамину, проводят посевы, учет результатов и контроль.

Споры тест-микроорганизмов: *B. cereus* (шт. 96), *B. subtilis* (шт. 7), *B. anthracis* (шт. 81/1 и 27), живой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 должны быть устойчивы к 6 %-му раствору перекиси водорода не менее 60 мин.

Определение устойчивости спор *B. subtilis* (шт. 7) к 2,5 %-му раствору глутарового альдегида. Определяют концентрацию глутарового альдегида в исходном (концентрированном) растворе глутарового альдегида. В экспериментах используют средство, содержащее не менее 20 % глутарового альдегида. Раствор для исследований, содержащий 2,5 % глутарового альдегида, готовят путем разведения исходного раствора стерильной питьевой водой с последующим доведением pH приготовленного раствора до значений 7,5. Подготовку и определение устойчивости спор *B. subtilis* (шт. 7) к 2,5 %-му раствору глутарового альдегида проводят по такой же методике, как и к хлорамину, используя батистовые тест-объекты, контаминированные этим тест-микроорганизмом, только в качестве нейтрализатора используют или стерильный 1 %-й раствор бисульфита натрия или стерильный универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3 %), сапонин (0,1 %), гистидин (0,1 %), цистеин (0,1 %). Учитывая, что споры некоторых тест-микроорганизмов должны быть устойчивы к воздействию 2,5 %-го раствора глутарового альдегида не менее чем в течение 3 ч, испытание осуществляют в течение 6 ч с отбором проб (по 2 тест-объекта) через каждые 30 мин. Посевы, учет результатов и постановку контроля осуществляют аналогично определению устойчивости спор к хлорамину.

Споры тест-микроорганизма *B. subtilis*, (шт. 7) должны быть устойчивы к 2,5 %-му раствору глутарового альдегида не менее 3 ч.

4. Обеспечение стандартности условий проведения исследований спороцидной активности ДС, СС и их субстанций

Химико-аналитический контроль ДС, СС и их субстанций. До проведения исследования спороцидной активности ДС, СС и их субстанций необходимо проанализировать представленные производителем утвержденные рецептуры средства и технические условия на отечественные или спецификацию на зарубежные средства, провести химико-аналитические исследования по определению концентрации действующих веществ и определить соответствие ее и других показателей, регламентированных вышеуказанными документами. При этом используют химико-аналитические методы контроля и применяют условия хранения средства и меры безопасности при работе с ним, предложенные производителем средства.

Выбор, приготовление и контроль эффективности нейтрализаторов ДС с целью исключения остаточного спороцидного или споростатического действия ДС, СС и их субстанций на тест-микроорганизмы. Для дезинфекции и стерилизации применяют средства, обладающие спороцидным действием, т. е. убивающие споры, но не задерживающие только их рост. Поэтому при определении спороцидного действия необходимо разграничить спороцидное действие средства от споростатического.

На основании накопленного опыта для нейтрализации антимикробного действия ДВ из различных химических групп (в зависимости от концентрации ДВ в растворе) применяют следующие нейтрализаторы:

- для средств из группы окислителей (хлор-, йод-, перекисьсодержащие средства; средства, содержащие надуксусную кислоту, озон) – 0,5—2,5 % растворы тиосульфата натрия;
- для альдегид- и фенолсодержащих средств – универсальный нейтрализатор, содержащий 3 % полисорбита 80 % (Твин-80), 3 % сапонина, 0,1 % гистидина и 0,1 % цистеина; или 3 % полисорбита 80 %, 2 % гистидина, 0,3 % лецетина, 3 % сапонина;
- для катионных поверхностно-активных веществ – 1,0 %-й раствор сульфонола или 0,5—1,0 %-е растворы сульфонола с 10 %-м обезжиренным молоком;
- для композиционных ДС – универсальный нейтрализатор, например, содержащий 3 % полисорбита 80 %, 3 % сапонина, 0,1 % гистидина и 0,1 % цистеина или 3 % полисорбита 80 %, 3 % сапонина, 0,3 % лецетина и 0,15 % цистеина, 0,15 % тиосульфата натрия, или другие нейтрализаторы, рекомендуемые производителями.

Растворы нейтрализаторов готовят в асептических условиях, применяя только стерильную дистиллированную воду. При невозможности соблюдения асептических условий приготовления нейтрализаторов допускается стерилизация готовых растворов автоклавированием при 1,1 кГс/см² (121 °С) в течение 15 мин. Температура растворов нейтрализаторов должна быть 20 °С, независимо от температуры окружающей среды. Готовые растворы необходимо использовать в день приготовления. Допускается хранение готовых растворов при температуре 4 °С в течение 48 ч.

Контроль полноты нейтрализации остаточного действия испытываемого средства. Существующие рекомендации по применению нейтрализаторов рассчитаны для различных монодействующих веществ (ДВ). Однако многие современные ДС содержат несколько ДВ и другие вспомогательные вещества, которые могут обладать спороста тическим действием. Поэтому существующие (рекомендуемые) нейтрализаторы могут не обеспечивать эффективную нейтрализацию остаточного действия таких ДС. В этой связи результаты оценки эффективности ДС могут быть необъективными. По-

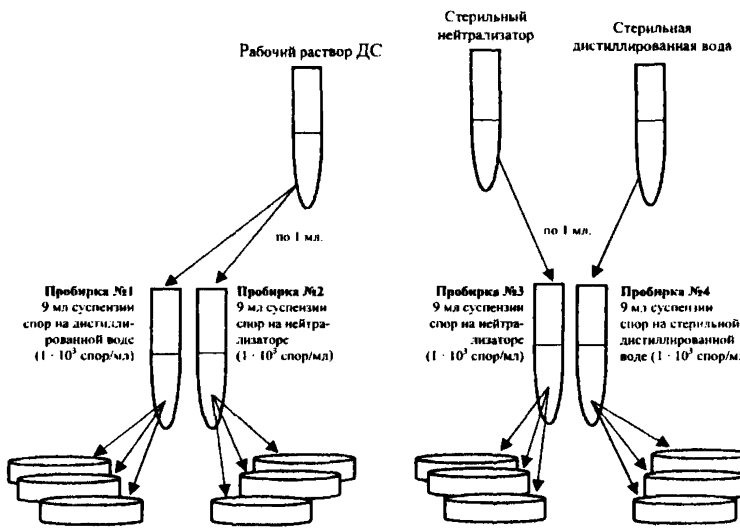

Рис. 2. Принципиальная схема проведения эксперимента по контролю эффективности нейтрализации действия ДС на споры тест-микроорганизма используемым нейтрализатором

Таблица 3

Назначение операций эксперимента по оценке эффективности нейтрализации остаточного действия ДС

№ пробы	Назначение операции исследования	Процедура выполнения операции исследования	Ожидаемый результат
1	Контроль губительного действия ДС	к 9 мл суспензии спор (10^3 спор/мл) на дистиллированной воде + 1 мл раствора ДС (перемешать встряхиванием пробирки)	Рост микроорганизмов должен отсутствовать
2	Контроль полноты нейтрализации ДС	к 9 мл суспензии спор (10^3 спор/мл) с нейтрализатором + 1 мл раствора ДС (сразу интенсивно перемешать встряхиванием пробирки)	Примерно одинаковое (или в пределах ошибки в 25 %) КОЕ в посевах проб (по 0,1 мл) на плотной питательной среде
3	Контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора	к 9 мл суспензии спор (10^3 спор/мл) с нейтрализатором + 1 мл раствора нейтрализатора (перемешать встряхиванием пробирки)	
4	Референс-контроль количества спор тест-микроорганизма	к 9 мл суспензии спор (10^3 спор/мл) на дистиллированной воде + 1 мл дистиллированной воды (перемешать встряхиванием пробирки)	

Примечание. Спустя 5 мин после постановки опыта, из каждой из четырех проб производят посев смеси по 0,1 мл, как минимум, на 3 чашки Петри с питательной средой, которые инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С и через 2—4 сут. учитывают результаты исследований.

этому каждый случай проведения испытаний, даже известного ДС, должен предварительно сопровождаться экспериментальным контролем эффективности нейтрализации остаточного действия ДС на тест-микроорганизм.

Для контроля эффективности нейтрализатора и полноты нейтрализации остаточного действия ДС используют суспензионный метод, как обеспечивающий наиболее жесткие условия действия нейтрализатора при проведении испытаний ДС. Последовательность и методология выполнения основных операций при прове-

дении такого эксперимента и их назначение приведены на схеме рис. 2 и в табл. 3.

Обеспечение техники безопасности при исследовании спороцидной активности ДС, СС и их субстанций. Споры тест-микроорганизмов обладают высокой устойчивостью, поэтому их гибель обеспечивают в большинстве случаев высокие концентрации ДС, СС и их субстанций и по препарату, и по ДВ. Поэтому при хранении, взвешивании, приготовлении рабочих растворов, их химико-аналитических исследованиях и проведении экспериментов необходимо применять меры защиты, предусмотренные в технических условиях на отечественные средства или спецификации – на зарубежные, с учетом класса опасности.

Все тест-микроорганизмы, кроме патогенных штаммов возбудителя сибирской язвы, относятся к III—IV классу опасности (патогенности), поэтому микробиологические исследования с ними следует проводить в асептических условиях при соблюдении правил техники безопасности, предусмотренных СП 1.3.000—06 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами» [9].

Лабораторные исследования с использованием патогенных штаммов возбудителя сибирской язвы должны проводить специалисты, прошедшие подготовку на курсах по особо опасным инфекциям, в лицензированных лабораториях, имеющих допуск на работу с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности) при строгом соблюдении всех правил техники безопасности, предусмотренных СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности» [8].

5. Методы исследований и оценки результатов спороцидной активности ДС, СС и их субстанций *in vitro*

5.1. Суспензионный метод

Суспензионный метод оценки спороцидной активности ДС и их субстанций используют для получения первичной информации о концентрации и времени эффективного (отсутствие жизнеспособных спор) спороцидного действия ДС. Методология выполнения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС суспензионным методом приведена на схеме рис. 3.

Как видно из схемы рис. 3, для проведения опыта по оценке спороцидной активности ДС суспензионным методом необходимо приготовить:

• рабочую суспензию тест-микроорганизма с концентрацией спор не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (это обеспечивает возможность соз-

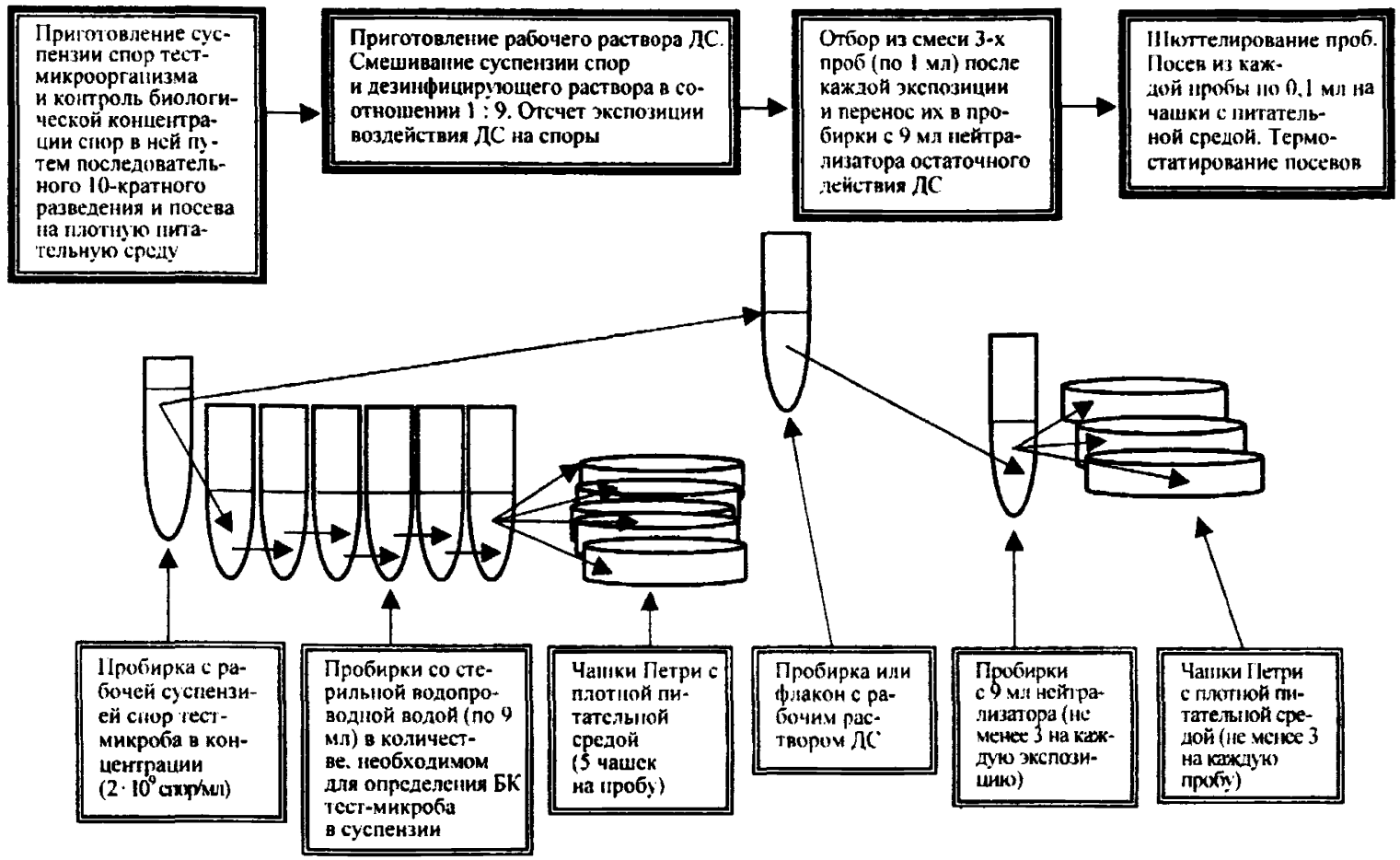

Рис. 3. Схема алгоритма проведения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС суспензионным методом

дания в смеси ДС с суспензией (обоснованной и применяемой для этого метода оценки ДС) концентрации спор порядка $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл);

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

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

• необходимое количество пробирок (в зависимости от количества проб, отбираемых для определения времени, обеспечивающего полную гибель спор тест-микроорганизма), содержащих по 9 мл нейтрализатора, проверенного предварительно на эффективность нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС на тест-микроорганизм (п. 4);

• чашки Петри со стерильной плотной питательной средой в количестве, необходимом для посева пробы контроля исходной суспензии и проб контроля эффективности действия ДС на тест-микроорганизм.

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

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

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

• проведение контроля реальной на момент проведения опыта биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии (п. 3.3);

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

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

• по окончании каждой заданной экспозиции проводят отбор пробы в количестве 3 мл, которую по 1 мл вносят в 3 пробирки, содержащие по 9 мл стерильного раствора нейтрализатора;

• перемешивание пробы путем встряхивания в течение 1—2 мин (или в течение 5 мин на шейкере) и посев из них стерильно на поверхность плотной питательной среды в чашках Петри (по 0,1 мл на каждую чашку и не менее чем на 3 чашки из каждой пробы).

В опытах с вирулентным тест-микроорганизмом возбудителя сибирской язвы, кроме посева на твердую питательную среду, пробу по 0,2 мл вводят внутрибрюшинно белым мышам весом по 10—12 г. Параллельно проводят контрольное заражение животных питательной средой с нейтрализатором и суспензией спор исходного тест-микроорганизма. Количество животных в контрольных группах – не менее 3. Наблюдают за животными в течение 48—96 ч. Как павших, так и усыпленных эфиром мышей вскрывают, делают посев органов на элективные среды для выявления роста возбудителя сибирской язвы и его идентификации;

• инкубирование чашек Петри с посевами проб при температуре (37 ± 1) °С или (55 ± 1) °С в зависимости от тест-микроорганизма в течение 2—7 сут. и учет результатов.

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

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

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин полную гибель спор одного из рекомендуемых споровых тест-микроорганизмов, рассматривают как перспективное спороцидное средство для дальнейшего изучения: определения спектра спороцидного действия, факторов, влияющих на спороцидную активность ДС и др.

5.2. Метод батистовых тест-объектов

Как и суспензионный метод оценки спороцидной активности ДС и их субстанций, так и метод батистовых тест-объектов используют для получения информации о концентрации и времени эффективного спороцидного действия ДС. В принципиальном плане методология выполнения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС методом батистовых тест-объектов приведена на схеме рис. 4.

Как видно из схемы рис. 4, для проведения опыта по оценке спороцидной активости ДС методом батистовых тест-объектов необходимо приготовить:

• стерильные батистовые тест-объекты размером 1 × 0,5 см путем погружения куска батиста на 24 ч в холодную питьевую воду для удаления аппретуры. Затем ткань тщательно стирают с мылом, прополаскивают в холодной воде, кипятят, сушат и гладят горячим

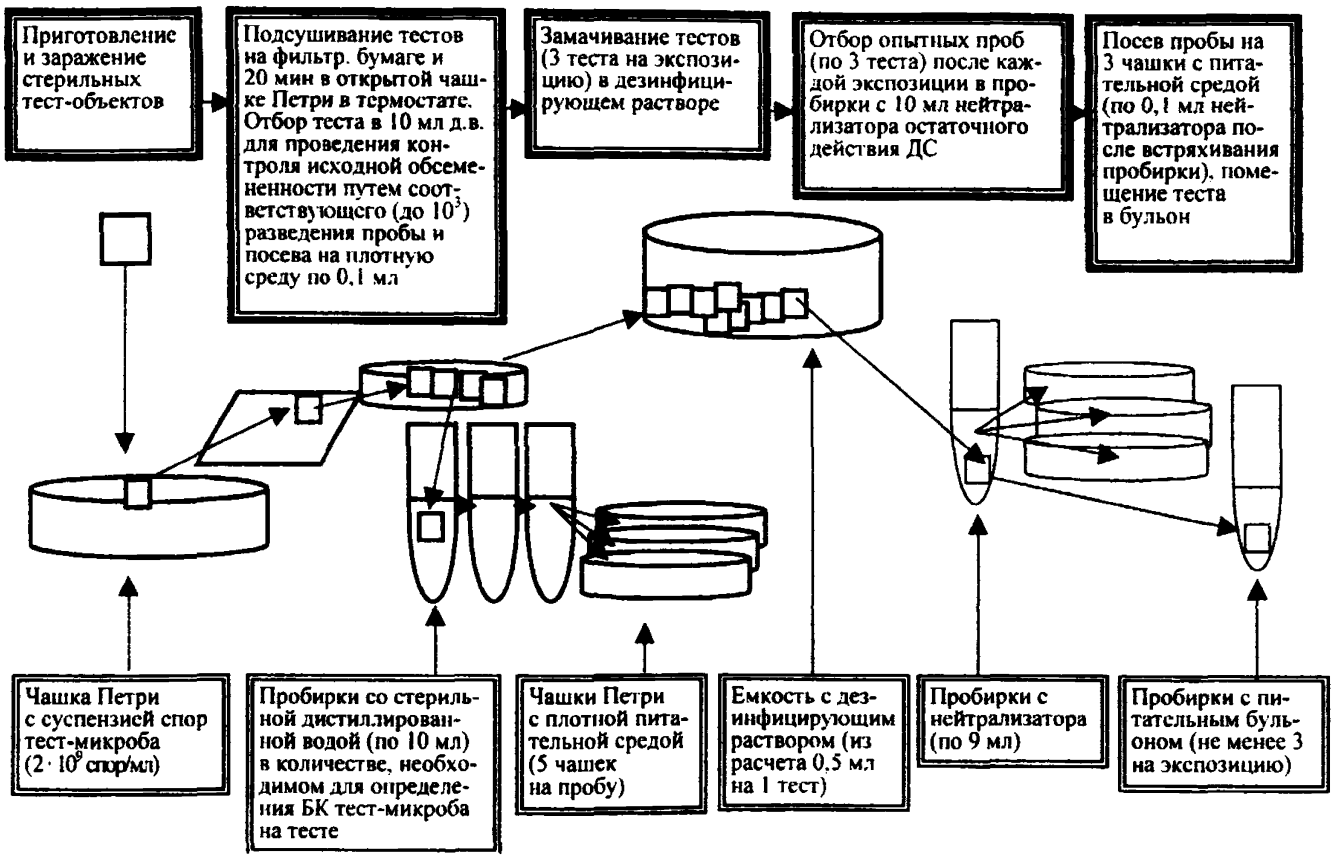

Рис. 4. Схема алгоритма проведения эксперимента по оценке спороцидной активности ДС методом батистовых тест-объектов

утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 11 мм друг от друга, а в поперечном направлении – 6 мм. По этим линиям батист разрезают ножницами на отдельные тест-объекты; раскладывают по 50 штук в чашки Петри, упаковывают в бумагу и стерилизуют в паровом стерилизаторе;

• рабочую суспензию тест-микроорганизма с концентрацией спор не менее $1 \cdot 10^9$ спор/мл для контаминации батистовых тест-объектов;

• пробирки со стерильной питьевой водой (10 мл) для контроля реальной биологической концентрации тест-микроорганизма на контаминированных тест-объектах;

• испытываемый раствор ДС в ёмкости (пробирка, колба или стакан) в количестве, достаточном для замачивания всех взятых в опыт тест-объектов, исходя из расчета 0,5 мл раствора на 1 тест-объект;

• необходимое количество пробирок (в зависимости от количества проб, отбираемых для определения времени полной гибели спор тест-микроорганизма под действием ДС), содержащих по 9 мл нейтрализатора, проверенного предварительно на эффективность нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС на тест-микроорганизм (п. 4);

• чашки Петри со стерильной плотной питательной средой для посева проб контроля БК тест-микроорганизма на тест-объекте и проб контроля эффективности действия ДС на тест-микроорганизм.

Методика проведения самого опыта по оценке спороцидной активности ДС предусматривает, как видно из схемы, последовательное выполнение следующих операций (рис. 4):

• тщательное перемешивание хранимой в пробирке или во флаконе при температуре (6 ± 2) °С исходной суспензии агаровой культуры тест-микроорганизма путем встряхивания пробирки (флакона) в течение 2—3 мин; приготовление из нее рабочей суспензии тест-микроорганизма в концентрации спор не менее $1 \cdot 10^9$ спор/мл и в количестве, достаточном для контаминации используемых в опыте тест-объектов (из расчета 0,2 мл на тест-объект);

• контаминация батистовых тест-объектов тест микроорганизмом. Для этого помещают в чашку Петри необходимое для опыта количество стерильных батистовых тест-объектов; заливают их приготовленной рабочей суспензией спор тест-микроорганизма, обеспечивая их равномерное смачивание, и оставляют их в суспензии в закрытой чашке Петри на 20 мин. С соблюдением асептики контаминированные тест-объекты переносят на стерильную фильтровальную бумагу, уложенную в два слоя в стерильной чашке

Петри, покрывают их листом такой же бумаги и закрывают чашку крышкой; через 10 мин перекладывают тест-объекты на сухую стерильную фильтровальную бумагу в стерильной чашке Петри и подсушивают в термостате при (37 ± 1) °С в течение 60 мин с приоткрытыми крышками. Высушенные тест-объекты, контаминированные спорами тест-микроорганизма, помещают в чашки Петри в холодильник и хранят при температуре (6 ± 2) °С, используя для проведения опытов в течение не более 3—4 сут.;

• с целью контроля микробной контаминации тест-объектов определяют биологическую концентрацию спор на них. Для этого контаминированные спорами батистовые тесты погружают в пробирки с 10 мл стерильной питьевой воды и встряхивают в течение 10—15 мин на шейкере для отмывания спор с тест-объекта. Затем делают 3 последовательных 10-кратных разведения, чтобы получить суспензию с концентрацией порядка $1 \cdot 10^3$ спор/мл, из которой производят посев по 0,1 мл на 5 чашек с плотной питательной средой. Посевы инкубируют в термостате при (37 ± 1)— (55 ± 1) °С в течение 2—4 сут. и подсчитывают общее количество выросших на чашках КОЕ. Используя формулу определения БК, приведенную в п. 3.3., рассчитывают количество жизнеспособных спор тест-микроорганизма на тест-объекте;

• приготовление испытываемого рабочего раствора ДС в соответствующей емкости из расчета 0,5—1,0 мл на тест-объект;

• помещение испытываемого рабочего раствора ДС на водяную баню с заданной температурой. Если задачей эксперимента не предусмотрено изучение влияния воздействия температуры на эффективность средства, то оценка эффективности раствора испытываемого средства осуществляется при температуре 18—20 °С;

• замачивание необходимого для обеспечения отбора проб количества контаминированных тест-объектов в дезинфицирующем растворе с заданной температурой и отсчет по секундомеру времени начала воздействия ДС на тест-микроорганизм;

• отбор (по окончании каждой заданной экспозиции) стерильным пинцетом (петлей) тест-объектов (не менее 3 на экспозицию), которые помещают в пробирку с 10 мл заранее проверенного на эффективность нейтрализатора остаточного действия ДС на тест-микроорганизм.

Определение наличия жизнеспособных спор на тест-объекте. Если предусматривается только установление наличия на данную экспозицию оставшихся на тест-объекте жизнеспособных спор тест-микроорганизма, то проба не подвергается встряхиванию, а тесты стерильным пинцетом извлекают из нейтрализатора и помещают в пробирку со стерильным питательным бульоном. Если предусматривается количественное определение оставшихся на тест-

объекте жизнеспособных спор тест-микроорганизма, то на стерильную плотную питательную среду в чашках Петри сеят по 0,1 мл стерильной пипеткой из нейтрализованной пробы (или из ее соответствующего разведения), полученной после интенсивного встряхивания тест-объектов вручную в течение 5—10 мин на шейкере;

• инкубирование посевов в чашках Петри или пробирках проводят при температуре (37 ± 1)—(55 ± 1) °С в зависимости от вида тест-микроорганизма в течение 2—4 сут.;

• учет и анализ результатов эксперимента (испытания).

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

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

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин полную гибель спор одного из рекомендуемых споровых тест-микроорганизмов, может рассматриваться как перспективное спороцидное ДС для дальнейшего изучения.

Исследование спектра спороцидной активности химических ДС, СС и их субстанций проводят с использованием следующих тест-микроорганизмов:

B. cereus, *B. subtilis*, *B. anthracis*, сибиреязвенной сухой живой вакцины СТИ-1. Дальнейшие исследования проводят, используя наиболее устойчивый тест-микроорганизм.

5.3. Методы изучения факторов, влияющих на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций

Для определения сферы применения и направлений дальнейших исследований необходимо изучить спектр спороцидной активности ДС, СС и их субстанций и зависимости его от температуры, величины pH и присутствия белковых загрязнений.

Исследования проводят методом батистовых тест-объектов (п. 5.2).

Определение спектра спороцидного действия ДС, СС и их субстанций используют споровые тест-микроорганизмы, рекомендуемые для изучения и оценки спороцидной активности (п. 3, табл. 1).

На основании полученных данных определяют целесообразность дальнейших исследований для применения в качестве ДС, СС и их субстанций.

Определение влияния температуры на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций проводят с целью выявления возможности использования подогретых растворов ДС для сокращения времени обеззараживания объектов в отношении спор тест-микроорганизмов, а также для оценки эффективности спороцидных свойств при пониженных температурах окружающей среды, обеззараживаемого объекта и самого раствора ДС.

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

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

Опыты по оценке влияния пониженной температуры на активность ДС проводят с использованием криостата или солевых низкозамерзающих растворов, в которых охлаждают емкость с дезинфицирующим раствором до (10 ± 1) °С, (5 ± 1) °С, (–20 ± 1) °С и поддерживают эти температуры в процессе опыта. После достижения указанной температуры в раствор ДС погружают батистовые тест-объекты, контаминированные тест-микроорганизмом из расчета 2 тест- объекта на каждую экспозицию.

Через определенные промежутки времени из каждой колбы извлекают по 2 тест-объекта и помещают их в пробирки с соответствующим нейтрализатором на 5 мин, затем во вторую пробирку со стерильной водопроводной водой на 5 мин и только после этого каждый тест-объект переносят в пробирку, заполненную 5 мл бульона Хоттингера (pH 7,2). Посевы инкубируют в течение 48—72 ч при (37 ± 1) °С. Контролем служат по 2 тест-объекта при каждой исследованной температуре, не подвергавшиеся действию испытуемого ДС, но погруженные в пробирки со стерильной питьевой водой на срок, равный действию испытуемого ДС.

Определение влияния величины pH на спороцидную активность ДС, СС и их субстанций начинают с приготовления рабочих растворов ДС, имеющих различную величину pH (5,6—6,0; 7,0; 8,5—9,0). Для подкисления раствора используют децинормальный раствор соляной или другой кислоты, а для подщелачивания – децинормальный раствор щелочи. В подготовленные растворы погружают контаминированные спорами батистовые тест-объекты. Исследование зависимости спороцидной активности ДС, СС и их субстанций от величины pH проводят по методике, описанной выше, только при нейтрализации действия действующих веществ одновре-

менно понижают и величину pH, добавляя соответственно кислоту или щелочь.

Определение влияния белковых загрязнений на спороцидную активность ДС проводят с целью выявления возможности влияния (или установления его отсутствия) белковых загрязнений на обеззараживаемом объекте на спороцидную активность ДС.

Исследование проводят методом батистовых тест-объектов (п. 5.2), только для контаминации тест-объектов используют суспензию спор тест-микроорганизма, содержащую 20 % инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови, которые добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию нормальной сыворотки крупного рогатого скота проводят дробным трехкратным прогреванием на водяной бане при температуре (60 ± 1) °С в течение 30 мин. Если активность препарата не снижается в присутствии 20 % белка, концентрацию инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови в суспензии тест-микроорганизма, увеличивают до 40 %. Отсутствие снижения спороцидной активности ДС при добавлении и 40 % сыворотки позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

6. Методы исследования спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме

Длительная выживаемость спор возбудителей сибирской язвы, газовой гангрены и столбняка во внешней среде обосновывает необходимость обеззараживания большого перечня объектов, которые могут быть контаминированы возбудителем сибирской язвы при уходе за больными животными, захоронении их трупов, транспортировании, реализации, переработке и уничтожении продуктов и сырья, полученных от больных животных, в очаге на дому при выявлении лиц, больных сибирской язвой, в лечебно-профилактических учреждениях при оказании медицинской помощи больным сибирской язвой, газовой гангреной и столбняком, в специализированных бактериологических лабораториях, работающих с этими возбудителями, на предприятиях по производству биопрепаратов на их основе, а также при биотеррористическом использовании возбудителя сибирской язвы.

Учитывая вышесказанное, перечень тест-объектов, моделирующих объекты, подлежащие дезинфекции, включает: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-техни-

ческого оборудования, транспортных средств и др.; изделия медицинского назначения, в т. ч. эндоскопы; предметы ухода за больными, игрушки; посуду столовую, лабораторную и из-под выделений; белье, одежду, спецодежду и другие объекты из тканей; изделия из резины, в т. ч. перчатки, сапоги, фартуки и др.; обувь; руки в резиновых перчатках; остатки пищи; выделения: фекалии, мочу, кровь, мокроту; воду; воздух; медицинские отходы.

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

В исследованиях используют тест-поверхности (10 × 10 см) из различных материалов: дерева (окрашенные масляной или клеевой и другими красками; оклеенные обоями и неокрашенные), линолеума, пластика, кафеля, фаянса, плитки, металлов, стекла.

Тест-поверхности из различных материалов (за исключением поверхностей, окрашенных клеевой краской и оклеенных обоями) тщательно моют водой с мылом и щеткой, стерилизуют в паровом стерилизаторе. Тест-поверхности, окрашенные клеевой краской и оклеенные обоями, протирают несколько раз стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой. Готовят суспензию тест-микроорганизма (*B. cereus*, сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 для людей, *B. anthracis*), содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, добавляют 40 % лошадиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин (к 6 мл суспензии, содержащей $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, прибавляют 4 мл сыворотки).

После подсыхания тест-поверхности располагают горизонтально и на них с помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки наносят 0,5 мл суспензии спор тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по всей тест-поверхности (100 см^2) стерильным стеклянным шпателем. Если суспензия тест-микроорганизма не распределяется равномерно, а собирается в каплю, растирание шпателем по тест-поверхности осуществляют неоднократно (3—5 раз). Контаминированные тест-поверхности подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30—120 мин). Обеззараживание тест-поверхностей осуществляют способами протирания или орошения дезинфицирующим раствором (при работе с *B. anthracis* применяют только орошение в боксе биологической защиты при предварительном подсушивании не более 20 мин).

При проведении экспериментов тест-поверхности, окрашенные клеевой и другими красками, или оклеенные обоями, распола-

гают вертикально и обеззараживают путем орошения дезинфицирующим раствором. Остальные тест-поверхности обеззараживают как в горизонтальном, так и в вертикальном положениях путем орошения, однократного или двукратного протирания, или мытья дезинфицирующим раствором.

В зависимости от вида обрабатываемой поверхности и наличия загрязнений на ней норма расхода ДС способом протирания равна 100—150 мл/м² (1—1,5 мл на 100 см²); способом орошения – 150 мл/м² (1,5 мл на 100 см²) при обработке распылителем типа «Квазар» или его аналогами и 300—500 мл/м² (3—5 мл на 100 см²) при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом.

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

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени (15—30—60 мин) с тест-поверхностей делают смывы путем тщательного протирания тест-поверхности сначала в одном, а затем в перпендикулярном направлении стерильной марлевой салфеткой (5 × 5 см), увлажненной нейтрализатором. После протирания на тест-поверхности не должно оставаться излишней влаги. Салфетки погружают на 5 мин в пробирки (емкости) с соответствующим для испытуемого ДС нейтрализатором (10 мл), а затем в стерильную питьевую воду с бусами и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Полученную смывную жидкость вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри, тщательно распределяя по всей поверхности. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 48—72 ч.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных тест-поверхностей вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду из того же расчета, что и опытные. Жидкость, в которую помещают стерильную марлевую салфетку после взятия смыва с контрольных поверхностей, перед посевом разводят в 100 раз и вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Учитывают результаты через 48 ч (предварительные), а окончательные – через 21 сут.

Оценку результатов контрольных опытов проводят по посеву того разведения, в котором число КОЕ на поверхности питательного агара в чашке Петри составляет от 30 до 300.

После выдерживания посевов в термостате подсчитывают число КОЕ на чашках с агаром, рассчитывают плотность контаминации на 100 см² и высчитывают эффективность обеззараживания, принимая количество тест-микроорганизмов, снятых с контрольных тест-объектов, за 100 %.

Например, на посевах со 100 см² контрольной тест-поверхности обнаружено 148 000 КОЕ, а с аналогичного вида опытной тест-поверхности – 20 КОЕ.

$$\begin{matrix} 148\,000 - & 100\ \% \\ 20 & - \ x \end{matrix} \quad x = 20 \times 100 : 148\,000 = 2 : 148 = 0{,}013\ \%$$

Эффективность обеззараживания опытной тест-поверхности составляет:

$$100 - 0{,}013 = 99{,}987\ \%.$$

Критерий эффективности ДС при обеззараживании тест-поверхностей объектов, контаминированных тест-микроорганизмом в споровой форме, равен 100 %. При необходимости отработанные в лабораторных условиях режимы обеззараживания подлежат апробации на натурных объектах.

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

В исследованиях используют тест-объекты (100 см²) и предметы ухода за больными из различных материалов: резин на основе натурального и силиконового каучука (медицинская клеенка, грелка, груша); стекла (поильник, плевательница, градусник); пластмасс (грелка, лоток, наконечник для клизм); металлов (таз, стакан для термометра); игрушки (кроме мягких) из резин и пластмасс.

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

Готовят суспензию тест-микроорганизма, содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл, к которой добавляют 40 % лошадиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин (к 6 мл суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

С помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки на поверхность тест-объекта, предмета ухода за больными, игрушки наносят 0,5 мл суспензии спор тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по поверхности (100 см²) стерильным стеклянным шпателем. Каналы и полости предмета ухода за больными, игрушек заполняют с помощью шприца. Мелкие игрушки полностью погружают в суспензию. Контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (60—120 мин).

Растворы ДС готовят на питьевой воде при комнатной температуре. Обеззараживание осуществляют способом погружения, протирания, орошения. После подсушивания контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными, игрушки, в т. ч. имеющие каналы и полости, погружают в раствор испытуемого ДС или протирают салфеткой, смоченной им. Мелкие игрушки полностью погружают в емкость с раствором ДС, препятствуя их всплытию; крупные игрушки дезинфицируют способом орошения. Норма расхода ДС способом протирания из расчета 100—150 мл/м² при однократной обработке и 200—300 мл/м² при двукратной; способом орошения – 150 мл/м² при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 мл/м² – при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом. При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5—15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени после дезинфекции (30—60—120 мин) тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки извлекают из раствора, делают смывы стерильной марлевой салфеткой (5 × 5 см), увлажненной нейтрализатором (п. 6.1). Салфетки погружают в стерильный раствор нейтрализатора на 5 мин, затем переносят в пробирки (емкости) с бусами и стерильной питьевой водой (10 мл) и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Каналы и полости промывают нейтрализатором (10 мл), который собирают в стерильные пробирки (емкости) и оставляют на 10 мин для нейтрализации.

Полученную смывную жидкость и смывную жидкость из каналов вносят по 0,1 мл на поверхность питательного агара двух чашек Петри и равномерно распределяют стерильным шпателем по поверхности среды. В контрольных опытах вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду.

Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Предварительные результаты учитывают через 48 ч, а окончательные – через 21 сут.

Критерием эффективности ДС при обеззараживании тест-объектов, предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких), контаминированных тест-микроорганизмом в споровой форме является 100 % гибель тест-микроорганизмов.

6.3. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды столовой, лабораторной и из-под выделений

Для определения спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды, в качестве тест-объектов используют набор столовой и чайной посуды: тарелки, стаканы,

кружки из различного материала (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью); столовые приборы: ножи, вилки, ложки из различного материала (нержавеющая сталь, алюминий, пластик), посуду одноразового использования и набор лабораторной посуды, представляющий тест-объекты из стекла и пластмасс: предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического анализа и другое; посуда из-под выделений (мочеприемники, подкладные судна). Перед экспериментом посуду и столовые приборы моют водой с мылом и щеткой, затем высушивают.

В качестве тест-микроорганизмов для контаминации посуды используют наиболее устойчивый к данному ДС вид спор. Чаще всего для разработки режима дезинфекции посуды используют *B. cereus*, а затем эффективность разработанного режима проверяют с использованием микроорганизмов, встречающихся на посуде, в зависимости от цели исследований.

На посуду (площадь 100 см^2) пипеткой наносят взвесь тест-микроорганизмов из расчета 0,5 мл споровой взвеси, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл. Культуру равномерно распределяют по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы погружают в бактериальную суспензию на 1—2 мин, оставляя неконтаминированными их ручки. Контаминированную посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре (60—120 мин) и относительной влажности воздуха 50—60 % (при работе с *B. anthracis* подсушивают посуду не более 20 мин).

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

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды, столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор. Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора 18—20 °С. При необходимости изучают эффективность растворов ДС при температуре (50 ± 1) °С.

Дезинфицирующий раствор должен полностью заполнять и с избытком покрыть всю посуду и приборы (из расчета не менее 2 л на 1 комплект). Время обеззараживания посуды от 15 до 240 мин в зависимости от вида тест-микроорганизма и наличия загрязнения.

Через определенные интервалы времени (например 15, 30, 60 мин и т. д.) извлекают по одному предмету разных наименований (например тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т. д.) из дезинфицирующего раствора и стерильной марлевой салфеткой (5 × 5 см), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС, тщательно протирают контаминированную часть каждого контаминированного объекта и погружают в 10 мл этого же нейтрализатора на 5 мин, затем салфетку переносят в пробирку со стерильной питьевой водой и бусами. Время отмыва марлевой салфетки – 10 мин при постоянном встряхивании. После отмыва марлевую салфетку погружают в питательный бульон. Смывную жидкость по 0,1 мл вносят на поверхность питательного агара в 2—3 чашки Петри (по 0,1 мл в каждую и распределяют стерильным шпателем по всей поверхности среды). Посевы помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов проводят через 48 ч в течение 21 сут.

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

Критерием эффективности обеззараживания контаминированной посуды является гибель спор тест-микроорганизмов на посуде не менее 100 %.

6.4. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания изделий медицинского назначения (ИМН), включая эндоскопы

6.4.1. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания ИМН из различных материалов (кроме эндоскопов)

В качестве тест-изделий используют стерильные инструменты и ИМН, в т. ч. однократного применения, из различных материалов (металлов, резин, стекла, пластмасс) или имитирующие их тест-объекты. Перечень инструментов должен включать разнообразные по форме, характеру поверхности и используемому материалу изделия (гладкие изделия простой конфигурации; изделия, имеющие замковые части, каналы и полости, имеющие насечки и напыления, изделия извитой формы; изделия, изготовленные из нескольких видов материалов и т. д.).

На рабочую поверхность тест-изделия (у замковых изделий – также в область замка, а при наличии каналов и полостей – также в канал изделия) наносят 0,1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл тест-микроорганизма, содержащей 40 % инактивированной лошадиной сыворотки. Мелкие тест-изделия для конта-

минации погружают в эту суспензию на 15 мин. Контаминированные тест-изделия подсушивают в термостате в течение 20—25 мин. При испытании средств, обладающих фиксирующими свойствами (например, альдегиды), сыворотку добавляют в количестве 5 %.

Дезинфицирующие растворы готовят на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до (50 ± 1) °С.

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

Через определенное время (от 15 до 120 мин) изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой размером 5 × 5 см, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора на 5 мин, затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой водой и встряхивают с бусами в течение 5—10 мин. Для контроля эффективности обеззараживания делают посев смывной жидкости по 0,1 мл на поверхность соответствующего для тест-микроорганизма агаровой питательной среды, а салфетку помещают в бульон. Канал изделия промывают нейтрализатором, и смывную жидкость засевают по 0,1 мл на плотную питательную среду в чашках Петри. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 21 сут. Учет предварительных результатов проводят через 48 ч и окончательных – через 21 сут.

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

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

6.4.2. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания эндоскопов

В качестве тест-объектов используют фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий – гастроскоп, жесткий – цистоскоп). По 0,1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^9$ спор тест-микроорганизмов наносят с помощью пипетки на наружную поверхность и в канал эндоскопа, подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя полости и кана-

лы эндоскопа. Через определенное время (от 15 до 60 мин) изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой (5 × 5 см), смоченной в растворе нейтрализатора; салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же стерильного раствора нейтрализатора на 5 мин, а затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой воды, и встряхивают с бусами в течение 5—10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора и смывную жидкость засевают на питательный агар. Проводят также контроль микробной обсемененности использованных для отмыва проб раствора нейтрализатора и питьевой воды. Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

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

Положительной считается проба, показывающая характерный рост тест-микроорганизма на питательных средах; изменение жидкой питательной среды (помутнение, осадок, хлопья и т. д.) и характерный рост при посеве и пересеве на плотную питательную среду, или обнаружение тест-микроорганизма в растворе применявшегося нейтрализатора.

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

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

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

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

Оценку эффективности ДС для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани осуществляют с помощью стерильных тест-объектов, представляющих собой кусочки бязи размером 2 × 2 см. Бязь предварительно готовят и обеззараживают также, как батист. Контаминируют стерильные тест-объекты суспензией тест-микроорганизмов, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл, из

расчета 20 мл на 10 тест-объектов. Через 30 мин тест-объекты закладывают в бязевые мешочки размером 5 × 8 см (по 2 шт. в каждый), которые закрывают в виде конверта.

Раствор испытываемого ДС на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до (50 ± 1) °С готовят из расчета 5 л на 1 кг белья. Ветошь, имитирующую белье, поштучно погружают в емкость с раствором испытываемого ДС так, чтобы между слоями ткани не образовывалось воздушных прослоек, препятствующих процессу дезинфекции. Одновременно между слоями белья распределяют (сверху, в середине и внизу) мешочки с контаминированными тест-объектами. Через заданное время мешочки извлекают одновременно из трех слоев. Тест-объекты вынимают из мешочка стерильным пинцетом, помещают на 5 мин в емкость с раствором соответствующего нейтрализатора, затем переносят в стерильную питьевую воду и высевают в бульон Хоттингера (pH 7,2). Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 48 ч. Предварительный учет результатов проводят через 48 ч, а окончательный – через 21 сут. В контрольных опытах белье погружают в стерильную питьевую воду. Мешочки с тестами закладывают так же, как и в опыте. При получении 100 % гибели тест-микроорганизма в опытах по обеззараживанию белья без белковых загрязнений переходят к опытам по обеззараживанию белья, загрязненного выделениями.

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

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

При изучении эффективности обеззараживания изделий из синтетических тканей (капрон, ацетат, периацетат, лавсан и др.)

используют тест-объекты из этих тканей размером 5 × 5 см, т. к. микроорганизмы не проникают в структуру этих тканей и смываемость их в 2 раза больше, чем с батистовых тест-объектов.

6.5.1. Исследование спороцидной эффективности камерного метода обеззараживания

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

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

После дезинфекции мешочки извлекают из камеры и записывают показания максимальных термометров, а тест-объекты помещают в пробирки с 5 мл питательного бульона.

Инкубирование посевов с тест-объектами проводят при температуре (37 ± 1) °С в течение 21 сут. при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ). Предварительный учет результатов проводят через 24—72 ч, окончательный – через 21 сут. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение выросшей культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве контроля используют контаминированные тест-объекты, которые не помещали в камеру. Контрольные посевы выращивают с использованием тех же питательных сред, что и для опытных тест-образцов. Контрольные посевы и среду контролируют аналогично тест-объектам, которые обрабатывали в камере. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Контролем эффективности режима обеззараживания вещей в испытуемых дезинфекционных камерах является 100 % гибель спор тест-микроорганизмов.

6.6. Исследование спороцидной эффективности ДС при обеззараживании рук в резиновых перчатках

В качестве тест-микроорганизма используют лиофильно-высушенную сибиреязвенную сухую вакцину СТИ-1. Готовят споро-

вую суспензию путем внесения в ампулу с сухой вакциной 2 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения сухой вакцины получают суспензию, содержащую (1,0—5,0) · 10^8 спор/мл, которую разводят до содержания 10^3, 10^5 и 10^7 спор/мл.

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

Поверхность резиновых перчаток, надетых на руки испытателей-добровольцев, контаминируют путем тщательного растирания 1 мл споровой суспензии тремя вышеуказанными разведениями (каждое разведение на одного испытателя). После подсыхания микробной взвеси для контроля исходной обсемененности с поверхности резиновой перчатки тыльной стороны кисти делают смыв стерильной марлевой салфеткой размером 5 × 5 см, смоченной стерильной питьевой водой. Затем салфетку помещают в пробирку с с 10 мл стерильной питьевой воды с бусами и встряхивают 10 мин. Полученный смыв высевают по 0,5 мл в селективную жидкую питательную среду (9,5 мл) в пробирке.

Для обеззараживания поверхности перчаток в сжатую ладонь руки в печатке испытателю-добровольцу наносят 2,5 мл исследуемого спороцидного ДС.

Затем он в течение 10—15 с протирает этой порцией дезинфицирующего раствора поверхность перчаток обеих рук, совершая движения рук, которые выполняют при обработке кожи рук антисептиком. После этого такую же операцию проводят, нанося 2,5 мл дезинфицирующего раствора на ладонь второй руки и засекают по секундомеру начало экспозиции.

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

Эффективными считают режим применения ДС, обеспечивающий 100 % гибель исследованных спор вакцины СТИ-1 на резиновых перчатках, защищающих кожу рук.

6.7. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания воды

Методы распространяются на изучение спороцидной эффективности химических ДС при обеззараживании питьевой и природной воды, содержащей или подозрительной на содержание возбудителя сибирской язвы.

При определении спороцидной эффективности ДС в качестве тест-объектов используют водопроводную (дехлорированную), колодезную и речную воды. Водопроводную воду дехлорируют нагреванием при температуре (50—60) °С в течение 30—40 мин. Определяют физико-химические свойства питьевой дехлорированной воды и образцов природных вод. Кроме того, в последних определяют микробиологические показатели (общее микробное число и общее количество колиформных бактерий).

В качестве тест-микроорганизмов для контаминации исследуемых проб воды используют споровую культуру *B. cereus* (шт. 96) или сибиреязвенную живую сухую вакцину СТИ-1 для людей. Вирулентную культуру возбудителя сибирской язвы в этих целях использовать не разрешается из-за сложности соблюдения противоэпидемических мероприятий.

Контаминацию изучаемых образцов воды проводят путем внесения споровой культуры *B. cereus* (шт. 96) в виде суспензии, содержащей 10^8 спор/мл, а сибиреязвенную живую сухую вакцину СТИ-1 – в виде суспензии, приготовленной разбавлением содержимого одной ампулы вакцины в 10 мл стерильного физиологического раствора или стерильной водопроводной воды до содержания 10^8—10^9 спор/мл.

При постановке экспериментов исходную воду наливают в емкости с нижним тубусом объемом 5—10 л и вносят в воду вышеуказанные тест-культуры из расчета 10^5—10^6 спор/л. После тщательного перемешивания определяют концентрацию исходной контаминации воды. Для этого из емкостей отбирают 1—3 пробы воды объемом 3—5 мл. Из каждой пробы делают 3—4 последовательных десятикратных разведения стерильным физиологическим раствором или стерильной водопроводной водой, в которых затем определяют количество тест-микроорганизма в 1 мл пробы воды методом мембранной фильтрации.

Метод основан на концентрировании микроорганизмов из определенного объема анализируемой воды путем фильтрования через мембранные фильтры, выращивании посевов при температуре (37 ± 1) °С на плотной питательной среде, и подсчете количества тест-микроорганизмов в единице объема воды.

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

Фильтрование воды проводят с помощью прибора для мембранной фильтрации. Воронку и столик прибора перед анализом воды завертывают в бумагу и стерилизуют в паровом или воздушном стерилизаторе. На нижнюю часть прибора (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр; прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой); закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора; при соблюдении правил стерильности наливают необходимый объем исследуемой воды и создают вакуум в приемном сосуде.

Фильтруют вначале меньшие, а затем большие количества воды через один фильтровальный прибор, каждый раз сменяя мембранный фильтр.

После окончания фильтрования определенного количества воды фильтровальный стакан (воронку) снимают, а фильтр осторожно приподнимают за край фламбированным пинцетом при сохранении вакуума для удаления излишней влаги на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая, на поверхность казеинового или мясопептонного агара в чашках Петри, так чтобы между средой и фильтром не было пузырьков воздуха. Под каждым фильтром на обратной стороне дна чашки Петри делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева и номера пробы. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

По окончании инкубации учитывают количество колоний тест-микроорганизма, выросших на фильтрах, и определяют концентрацию их в 1 л воды по формуле:

$$C = \frac{k}{v} \times N \times 100, \text{ где}$$

С – количество спор, содержавшихся в 1 л воды;
k – кратность разведения;
v – посеянный объем воды в мл;
N – среднее арифметическое число колоний, выросших на мембранных фильтрах при посеве одинаковых разведений.

Результат анализа при определении числа спор в исходной воде выражается числом КОЕ в 1 л воды.

Для определения эффективности обеззараживания спороцидным ДС в емкость с водой, контаминированной спорами тест-микроорганизмов, вносят ДС в изучаемых концентрациях, воду тщательно перемешивают. Через заданные промежутки времени отбирают пробы воды объемом 1 л в стерильные флаконы с внесенным стерильным нейтрализатором, подобранным в концентрации, обеспечивающей нейтрализацию действующего агента изучаемого ДС.

В обеззараженной воде определяют число непогибших спор *B. cereus* или сибиреязвенной живой вакцины СТИ-1 для людей методом мембранной фильтрации. Пробы обеззараженной воды с нейтрализатором должны быть исследованы не позднее, чем через 1 ч после их отбора.

На начальных этапах изучения эффективности обеззараживания воды анализируют не менее двух проб, отличающихся по объему в 10 раз, и выбранных так, чтобы на одном фильтре выросло не более 300 колоний. На одну чашку Петри можно поместить 3—4 фильтра с условием, чтобы они не соприкасались друг с другом. При анализе обеззараженной воды на конечных этапах обеззараживания необходимо исследовать объем не менее 1 л, профильтровывая это количество не менее чем через 3—4 мембранных фильтра.

Посевы инкубируют как указано выше. Учитывают общее количество выросших КОЕ на фильтрах после фильтрования 1 л воды. Результат анализа выражают числом спор в 1 л обеззараженной воды.

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

В процессе статистической обработки результатов экспериментальных исследований рекомендуется использовать при определении концентрации контаминации исходной воды тест-микроорганизмами и на промежуточных этапах обработки среднюю арифметическую (x^-), а при оценке эффективности обеззараживания на завершающем этапе – медианное значение (Me).

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

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

σ – квадратичное отклонение;

I_p – максимально допустимое отклонение от средней; оцениваемое с вероятностью p = 0,99;

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

Если σ определяется по данным 16 опытов, то $t_{0,99} = 2,7$. Число проб для оценки содержания микроорганизмов в обеззараженной воде должно быть не менее 16.

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

Доверительный интервал средней арифметической определяют по данным величины квадратичного отклонения σ и средней ошибки σ_{x^-}.

Величину квадратичного отклонения вычисляют по формуле:

$$\sigma = \frac{\sum\left(x - x^-\right)^2}{n-1}, \text{ где}$$

$\sum\left(x - x^-\right)^2$ – сумма квадратов отклонений измерений от средней арифметической;

n – число отдельных измерений.

Среднюю ошибку вычисляется по формуле:

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

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

$$I_{0,99} = 2,7 \cdot \sigma_{x^-}.$$

Тогда доверительное значение количества микроорганизмов в пробе с вероятностью 0,99 находится в интервале $x^- \pm 2,7 \cdot \sigma_{x^-}$.

Доверительный интервал медианы для требуемого уровня вероятности 0,99 определяют в зависимости от числа проведенных опытов по табл. 4, в которой указаны номера опытов, результаты которых учитывают в качестве граничных значений доверительного интервала медианы.

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

Таблица 4

Граничные значения доверительного интервала медианы

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

Критерием оценки эффективности ДС при обеззараживании воды является отсутствие тест-микроорганизмов в 1 л воды.

6.8. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, фекалии, мокрота) кровь

Обеззараживание мочи. В качестве тест-объекта используют мочу, которую разливают в колбы или пробирки по 8 мл, добавля-

ют по 1 мл споровой суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл тест-микроорганизма и инактивированной лошадиной сыворотки.

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

Испытуемые концентрации растворов ДС добавляют к моче в равном или двойном объеме. Отмечают время контакта и через интервалы 15, 30, 60 мин пипеткой берут указанную смесь в количестве 1 мл и переносят в пробирки с 5 мл питательной среды (бульон Хоттингера, pH 7,2) и соответствующего нейтрализатора. После тщательного смешивания 1 мл жидкости из первой пробирки с бульоном переносят во вторую пробирку с бульоном (5 мл) и затем засевают по 0,1 мл на агар Хоттингера (pH 7,2) в чашках Петри, как из первой, так и из второй пробирки. Чашки Петри инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С.

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

Ориентировочный учет результатов проводят через 1 сут., предварительный – через 5—7 сут., окончательный – через 21 сут. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100 %. Окончательное заключение об эффективности ДС делают на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами.

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

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

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

Для приготовления 20 % эмульсии 20 г фекалий растирают в ступке и добавляют 80 мл воды; полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, стерилизуют в автоклаве, разливают пипеткой в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл $2 \cdot 10^9$ спор/мл в суспензии тест-микроорганизма. Опыты начинают ставить с концентрации, вызывающей гибель тест-микроорганизма в моче с белком через 30 мин. Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным по отношению к весу фекалий объемом дезинфицирующего раствора и в дальнейшем производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через 48 ч.

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

Посев жидкой части фекалий высевают так же, как и мочу. Плотные же части (комочки) забирают бактериологической петлей и помещают в 5 мл питательной среды с соответствующим нейтрализатором, растерев их о края пробирки и тщательно перемешав. Затем стерильной пипеткой переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, тоже содержащую бульон Хоттингера (pH 7,2). Как из первой, так и из второй пробирки производят посев на агар Хоттингера в чашках Петри (не менее чем в три чашки по 0,1 мл). Окончательный результат учитывают через 7 сут., а предварительный – через 24 ч.

Контролем служат аналогично поставленные опыты с добавлением вместо дезинфицирующего раствора воды. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100 %. Судят об эффективности исследуемого вещества на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами. Эффективным считают средство и режим его применения, обеспечивающие 100 % гибель спор тест-микроорганизмов в обеззараживаемом материале.

Обеззараживание крови и мокроты. В качестве тест-объектов при оценке спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания крови, используют кровь, а мокроты – куриный белок. В качестве тест-микроорганизма используют споры *B. cereus* (шт. 96). Для контаминации тест-объектов тест-микроорганизмом к 9 мл 40 % крови или 50 % куриного белка добавляют по 1 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей $2 \cdot 10^9$ спор/мл, перемешивают и разливают по 1 мл в стерильные флаконы. Затем во флаконы засыпают или наливают исследуемое ДС в объемных (5 %, 10 % и т. д.) соотношениях к объему исследуемого материала. Через определенные промежутки времени (1, 3 ч и т. д.) с помощью стерильной бактериологической петли производят отбор пробы смеси и переносят ее в 5 мл селективной жидкой питательной среды с соответствующим (заранее проверенным по эффективности нейтрализации ДС) нейтрализатором для нейтрализации остаточного действия ДС на споры тест-микроорганизма. По истечении 5 мин экспозиции из этой пробирки с помощью пипетки производят

высев по 0,2 мл исследуемой пробы на агар Хоттингера (pH 7,2) в чашках Петри. Пробирки и чашки с посевами инкубируют при (37 ± 1) °С.

Окончательный результат роста тест-микроорганизмов на чашках учитывают на 3—7 сут., а предварительный – через 24 ч пробирках, через 21 сут. и 24—48 ч соответственно.

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

6.9. Исследование спороцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов

При изучении спороцидной активности ДС с целью разработки режимов обеззараживания медицинских отходов используют тест-объекты из резин, пластмасс, текстильных материалов, стекла, металлов. Для приготовления тест-объектов стерильные одноразовые изделия медицинского назначения (бинты, ватные тампоны, фрагменты систем для переливания крови и лекарственных препаратов, катетеры, шпатели, шприцы, иглы, перчатки, одноразовое белье, салфетки, пипетки, трубки и пр.) измельчают и погружают в суспензию, содержащую $2 \cdot 10^9$ спор/мл *B. cereus* с 40 % инактивированной лошадиной сывороткой или сывороткой крупного рогатого скота. После достаточного пропитывания объекты извлекают в сухую стерильную емкость и подсушивают в термостате в течение 20 мин или при комнатной температуре 18—20 °С и относительной влажности воздуха 50—60 % в течение 1 ч.

Контаминированные тест-объекты погружают в емкость с испытуемым дезинфицирующим раствором так, чтобы он полностью закрывал их. Контроль эффективности обеззараживания объектов проводят через каждые 15—30 мин в течение времени от 30 до 360 мин. Для этого тесты из различных материалов (по два каждого наименования) извлекают из дезинфицирующего раствора, промывают в растворе соответствующего нейтрализатора и помещают в пробирки с жидкой питательной средой. Контрольные тест-объекты погружают на срок максимальной экспозиции в стерильную водопроводную воду, а затем в жидкую питательную среду. Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов проводят в течение 21 сут.

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

7. Методы исследования и оценки спороцидной активности ДС при использовании в качестве тест-микроорганизмов вирулентных штаммов *B. anthracis*

При использовании в качестве тест-микроорганизмов спор непатогенных штаммов (*B. cereus*, *B. subtilis*, сибиреязвенная живая сухая вакцина СТИ-1 и др.) спороцидную активность ДС определяют только культуральным методом, а при использовании вирулентного штамма *B. anthracis* – одновременно культуральным и биологическим. При культуральном методе результаты исследований оценивают по росту тест-микроорганизмов на питательных средах до и после действия ДС, а при биологическом – по гибели белых мышей от возбудителя сибирской язвы.

Трудность соблюдения противоэпидемических мероприятий при использовании вирулентных штаммов *B. anthracis* не дает возможности его применения при определении эффективности обеззараживания многих объектов (воды, камерного метода обеззараживания вещей и др.), поэтому для изучения спороцидной активности и эффективности ДС при обеззараживании различных объектов рекомендуется использовать непатогенные тест-микроорганизмы.

После установления спороцидной активности ДС культуральным методом, применяя вышеуказанные непатогенные тест-микроорганизмы, целесообразно проводить исследования культуральным и биологическим методами, используя *B. anthracis*, т. к. биологический метод позволяет отличить спороцидное действие ДС от споростатического, при отсутствии полной нейтрализации действующего вещества ДС химическими нейтрализаторами.

Спороцидная эффективность ДС с использованием спор вирулентных штаммов *B. anthracis* может быть изучена на следующих контаминированных тест-объектах: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и др.; изделий медицинского назначения; предметов ухода за больными; посуды, включая столовую, лабораторную и из-под выделений; белья, одежды, спецодежды и других объектов из тканей; изделий из резины, в т. ч. перчаток, сапог, фартуков и др.; выделений (фекалий, мочи, мокроты), крови, медицинских отходов. Эти исследования проводятся при строгом соблюдении всех правил безопасности, предусмотренных СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I и II группы патогенности (опасности)» в специализированных лабораториях, имеющих разрешения на работу с вирулентными штамма-

ми возбудителя сибирской язвы, соответствующее оборудование и подготовленный персонал.

Методика изучения спороцидной активности ДС при работе с *B. anthracis*. В качестве тест-микроорганизмов используют вирулентные штаммы *B. anthracis* (шт. 81/1 и 27, имеющие плазмиды pX01$^+$ и pX02$^+$), единичные клетки которых при внутрибрюшинном введении вызывают гибель биопробных животных. Характеристика этих штаммов, требования по устойчивости, питательные среды для культивирования приведены в п. 4 и прилож. 1 и 2.

Методы получения суспензии спор вирулентных штаммов *B. anthracis*, обеспечение стандартных условий проведения исследований спороцидной активности ДС и их субстанций, исследования спороцидной активности и эффективности при разработке режимов применения ДС для обеззараживания объектов внешней среды, контаминированных тест-микроорганизмами в споровой форме, изложены в пп. 3.2, 4, 5, 6.

При контроле спороцидного действия ДС на споры вирулентных штаммов *B. anthracis* действующее вещество необходимо сразу после окончания экспозиции нейтрализовать соответствующим нейтрализатором с последующим высевом на твердые и/или жидкие питательные среды (как изложено в предыдущих разделах).

Одновременно часть пробы исследуют при постановке биопробы, используя белых мышей весом 10—12 г в количестве 6 штук на постановку одной биопробы. Подготовленную и использованную пробу вводят внутрибрюшинно белым мышам в объеме 0,2 мл каждой. Параллельно проводят контрольные заражения животных раствором нейтрализатора (контроль отсутствия губительного действия нейтрализатора на белых мышей) и суспензией интактных (не подвергшихся воздействию ДС) спор вирулентных штаммов *B. anthracis* в заражающих дозах (контроль вирулентного действия использованной суспензии спор возбудителя). Количество животных в контрольных группах должно быть не менее 3.

Наблюдения за животными проводят в течение 48—96 ч; павших и выживших мышей вскрывают, делают посев из органов животных на агар Хоттингера (pH 7,0) для выделения возбудителя сибирской язвы.

Посевы подготовленных проб из органов животных инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48—96 ч. Идентифицируют и подсчитывают выросшие колонии *B. anthracis*.

Эффективным считается ДС, после воздействия которого в установленных режимах не обнаружены жизнеспособные клетки вирулентных штаммов *B. anthracis* при исследовании культуральным методом, и не наблюдается павших животных в опытной группе, в

пробах – высев из органов животных, с которыми проводили контроль патогенного возбудителя *B. anthracis*.

8. Методы исследования и оценки спороцидной эффективности СС, предназначенных для стерилизации ИМН, включая эндоскопы

8.1. Исследование спороцидной эффективности водяного насыщенного пара под избыточным давлением, предназначенного для стерилизации ИМН

Метод предназначен для исследования эффективности стерилизации ИМН водяным насыщенным паром под избыточным давлением, в т. ч. при испытаниях новых паровых стерилизаторов. Исследование проводят в паровых стерилизаторах при загруженной стерилизационной камере.

Для контроля эффективности стерилизации ИМН водяным насыщенным паром под избыточным давлением используют тест-объекты и тест изделия, контаминированные суспензией спор тест-микроорганизма *G. stearothermophilus*, а также биологические индикаторы, разрешенные к применению в установленном порядке, при паровом методе стерилизации в Российской Федерации.

В качестве тест-объектов применяют тест-образцы (0,5 × 1,0 см), нарезанные из резин, латекса, бязи, перевязочных материалов и др. Подготовленные тест-объекты стерилизуют паровым или воздушным методом (тест-объекты из резин, латекса, бязи, перевязочных материалов раскладывают в чашки Петри).

Из исходной суспензии спор *G. stearothermophilus* готовят суспензию, содержащую от $5{,}0 \times 10^7$ до $2{,}5 \times 10^8$ спор в 1мл. для контаминации тест-объектов. Стерильные тест-объекты контаминируют этой суспензией из расчета $(1{,}0 - 5{,}0) \times 10^6$ спор в объект путем нанесения на каждый тест-объект с помощью дозатора пипеточного 0,02 мл исходной суспензии. Контаминированные тест-объекты высушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч и закладывают в бумажные и комбинированные (полимерная пленка + бумага) пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов для парового метода стерилизации в Российской Федерации.

В качестве тест-изделий используют ИМН из коррозионностойких металлов (хирургические, стоматологические, гинекологические инструменты – корнцанги, зажимы, щипцы, пинцеты), стекла (пробирки, микропипетки), резин (катетеры, зонды, трубки), пластмасс (наконечники, лотки), которые предварительно стерилизуют паровым методом, а затем контаминируют исходной

суспензией спор тест-микроорганизма *G. stearothermophilus* (плотность контаминации 10^6 спор на тест-изделие) и упаковывают в бумажные пакеты или листовые материалы или бязь – при размещении изделий в коробках стерилизационных; в комбинированные пакеты – при размещении изделий в корзинах загрузочных.

Упаковки с контаминированными тест-объектами/тест-изделиями, а также биологическими индикаторами нумеруют и размещают вместе с максимальными термометрами в контрольные точки стерилизационной камеры вне коробок стерилизационных/корзин загрузочных у двери и задней стенки и в коробки стерилизационные/корзины загрузочные между изделиями.

Тест-объекты размещают между изделиями, применяемыми в качестве имитаторов загрузки, а также в изделиях – перчатках, халатах; тест-изделия – между изделиями, использующимися в качестве имитаторов загрузки.

Плотность загрузки коробок стерилизационных изделиями из резин и текстиля должна соответствовать нормам, приведенным в «Методических указаниях по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (от 30.12.98 МУ № 287-113). Указанные изделия, а также изделия из металлов и стекла в коробках стерилизационных и корзинах загрузочных, распределяют равномерно; пакеты заполняют изделиями не более, чем на $\frac{3}{4}$ объема.

Стерилизатор включают и после его выхода на режим (достижение номинального значения давления/температуры стерилизации) начинают отсчет времени выдержки. По окончании времени выдержки тест-объекты и тест-изделия вынимают из стерилизатора.

Тест-объекты из резин, латекса, бязи пинцетом, который обжигают в пламени, помещают в бактериологические пробирки с 5 мл питательного бульона (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ).

Для контроля стерильности крупных тест-изделий, подвергнутых обработке в стерилизаторе, осуществляют посев в питательный бульон марлевых салфеток (размер 5 × 5 см), с помощью которых производят отбор проб с изделий методом смыва. Салфетки предварительно увлажняют стерильным физиологическим раствором (0,9 %-й раствор натрия хлорида). У изделий, имеющих каналы, через последние пропускают физиологический раствор, после чего его засевают в питательный бульон.

Инкубирование посевов проводят при температуре (55 ± 1) °С в течение 7 сут. при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, СПБ, МПБ).

При наличии роста микроорганизмов производят сравнение выделенной культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве средств контроля используют тест-объекты и тест-изделия, которые не подвергают обработке в стерилизаторе. Посевы контрольных тест-объектов и тест-изделий или смывы с них в питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляют аналогично тест-объектам/тест-изделиям, которые подвергали обработке в стерилизаторе.

Аналогичную методологию исследования применяют и при отработке эффективных режимов стерилизации ИМН во вновь разрабатываемых паровых стерилизаторах. Для этого эксперименты проводят при различном времени выдержки и размещении тест-объектов/тест-изделий и максимальных термометров в различных точках стерилизационной камеры. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на (каждый режим) каждое время обработки.

Критерий эффективности водяного насыщенного пара под избыточным давлением для стерилизации ИМН является 100 % гибель спор *G. stearothermophilus* на тест-объектах и тест-изделиях (тест-объектах/тест-изделиях) из различных материалов, обработанных в исследуемом аппарате.

8.2. Исследование спороцидной эффективности сухого горячего воздуха, предназначенного для стерилизации ИМН

Метод предназначен для исследования эффективности стерилизации ИМН сухим горячим воздухом, в т. ч. при испытаниях новых воздушных стерилизаторов.

Исследование проводят в воздушных стерилизаторах при загруженной стерилизационной камере.

Для контроля эффективности стерилизации ИМН сухим горячим воздухом в качестве тест-изделий используют пробирки типа П2-21-200, ГОСТ-25336—82 (для стерилизаторов объемом стерилизационной камеры до 20 дм^3 включительно) и чашки биологические Петри с крышками низкие ЧБН-1-100 по ГОСТ-25336—82 (для стерилизаторов объемом стерилизационной камеры 40 дм^3 и более). Предварительно их стерилизуют паровым или воздушным методом и контаминируют суспензией спор тест-микроорганизма *B. licheniformis*. Кроме этого, используют биологические индикаторы, разрешенные к применению в установленном порядке, при воздушном методе стерилизации в РФ.

Из исходной суспензии спор готовят суспензию, содержащую от 10^8 до 10^9 спор *B. licheniformis* в 1 мл для контаминации тест-изделий из расчета 10^6 спор в/на тест-изделие, что достигается нанесением в/на каждое тест-изделие 0,02 мл суспензии с помощью дозатора пипеточного.

Контаминированные тест-изделия высушивают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч, затем их и имитаторы загрузки (пробирки и чашки Петри) упаковывают в листовую бумагу, в бумажные или полимерные пакеты, разрешенные к применению в качестве стерилизационных упаковочных материалов для воздушного метода стерилизации в Российской Федерации (пробирки – по 1 шт., чашки Петри – по 2 шт. в упаковке).

Упаковки с тест-изделиями, а также биологические индикаторы нумеруют и размещают на загрузочные полки в места размещения датчиков температуры (не менее 5 точек). Имитаторы загрузки равномерно размещают на загрузочные полки стерилизатора (количество имитаторов загрузки, в т. ч. тест-изделий) в зависимости от объема стерилизационной камеры составляет: 20 дм³ – 40 пробирок; 40 дм³ – 40 чашек Петри; 80 дм³ – 80 чашек Петри; 160 дм³ – 160 чашек Петри; 320 дм³ – 320 чашек Петри; 640 дм³ – 640 чашек Петри.

Стерилизатор включают и после достижения номинального значения температуры стерилизации начинают отсчет времени стерилизационной выдержки. По окончании времени стерилизационной выдержки тест-изделия и биологические индикаторы вынимают из стерилизатора. Пробирки заливают питательным бульоном (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ); чашки Петри – питательным агаром (агар Хоттингера, МПА, СПА).

Инкубирование тест-изделий проводят при температуре (37 ± 1) °С в течение 21 сут. при использовании питательного бульона (бульон Хоттингера, МПБ, СПБ); чашки Петри инкубируют в течение 7 сут. Учет результатов проводят путем визуального осмотра.

Отсутствие помутнения питательного бульона, роста микроорганизмов на чашке Петри указывает на гибель спор в/на тест-изделиях. При наличии роста микроорганизмов проводят сравнение выделенной культуры с тест-микроорганизмом.

В качестве средств контроля используют тест-изделия, которые не подвергают обработке в стерилизаторе. Посевы контрольных тест-изделий или смывы с них в питательную среду, а также инкубирование посевов осуществляется аналогично тест-изделиям, которые подвергали обработке в стерилизаторе.

Аналогичную методологию исследования применяют при отработке эффективных режимов стерилизации ИМН в стерилизаторах разных марок, в т. ч. во вновь разрабатываемых стерилизаторах. Для этого эксперименты проводят при различном времени выдержки и размещении тест-объектов и тест-изделий, датчиков температуры в различных точках стерилизационной камеры. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Критерием эффективности сухого горячего воздуха для стерилизации ИМН является 100 % гибель спор *B. licheniformis* на обработанных в исследуемом аппарате тест-объектах и тест изделиях из различных материалов.

8.3. Исследования спороцидной эффективности растворов химических СС, предназначенных для стерилизации ИМН

Культивирование спорообразующих тест-микроорганизмов, устойчивых к действующему веществу, входящему в состав изучаемого СС, приготовление суспензии спор, а также хранение контаминированных тест-изделий осуществляют согласно изложенному в п.п. 3.1—3.4.2. В качестве тест-носителей используют простерилизованные тест-образцы из различных материалов (пластмасс, резин на основе натурального и силиконового каучука, стекла, металлов), имитирующие ИМН, а также сами ИМН (катетеры, боры и зеркала стоматологические, зажимы, эндоскопы). Для контаминации тест-носителей используют споры тест-микроорганизма, обладающего наибольшей устойчивостью к раствору данного химического агента.

При испытании раствора средства на основе ранее не изучавшегося для этой цели действующего вещества, подбирают устойчивый спорообразующий микроорганизм, споры которого могут быть использованы в качестве тест-микроорганизма (п. 3.1).

С целью контаминации тест-изделий на них капельным способом наносят суспензию спор тест-микроорганизма (из расчета 10^6 микробных клеток в споровой форме на тест-изделие). Тест-микроорганизмы должны быть нанесены на наиболее сложные по конструкции и труднодоступные участки тест-изделий: в каналы, рабочие и замковые части. После этого тест-изделия подсушивают в течение 60 мин при температуре (37 ± 1) °С.

При проведении экспериментов изделия погружают в рабочие растворы таким образом, чтобы раствор полностью покрыл изделия (толщина слоя раствора над поверхностью изделий должна быть не менее 1 см) и заполнил все полости и каналы без воздушных пробок. Инструментами, имеющими замковые части, необходимо сделать несколько рабочих движений для лучшего проникновения раствора средства в области замка. При исследованиях используют растворы, имеющие комнатную температуру (18—20) °С. При испытании растворов альдегидсодержащих средств температура раствора должна составлять (20—22) °С. В случае необходимости (для повышения активности растворов) готовят рабочие растворы умеренно-повышенной температуры (50 ± 1) °С. Одновременно не менее чем по два тест-объекта помещают в воду, а также в раствор нейтрализатора, на

время, соответствующее максимальному исследуемому времени выдержки в изучаемом растворе средства.

Изучение эффективности средства и его рабочих растворов в зависимости от сроков хранения, а также (при необходимости) изучение эффективности рабочих растворов при многократном их использовании осуществляют аналогично указанному выше, применяя растворы средства с различными сроками хранения и кратностью использования для стерилизации.

При работе с тест-объектами и изделиями небольшого размера (боры) через определенные интервалы времени (в зависимости от состава средства) изделия извлекают из раствора исследуемого средства и последовательно осуществляют отмыв в растворе нейтрализатора и стерилизованной питьевой воде (по 5 мин) с последующим прямым посевом на жидкие питательные среды с 0,5 % глюкозы.

При работе с крупными изделиями для контроля стерильности подвергнутых обработке средством изделий осуществляют посев марлевых салфеток (размер 5 × 5 см), с помощью которых производят отбор проб с изделий методом смыва. Салфетки предварительно увлажняют раствором соответствующего нейтрализатора. При отмыве изделий, имеющих каналы, через последние пропускают раствор нейтрализатора. Если нейтрализатор для изучаемого средства не известен, целесообразно использовать универсальный нейтрализатор, проверенный на эффективность. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 14 сут.

Критерием эффективности является достижение 100 % гибели спор тест-микроорганизма на всех тест-изделиях. При этом время действия раствора должно составлять не более 16 ч при температуре (18—20) °С, и не более 3 ч при умеренно повышенной температуре (50 °С).

9. Метод исследования и оценки спороцидной эффективности СС, предназначенных для 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 (п. 3.1) из расчета 10^6 спор на каждый тест-объект. Контаминированные тест-объекты подсушивают при температуре (37 ± 1) °С в течение 120 мин.

Обработку исследуемым средством осуществляют способом погружения в исследуемый раствор, имеющий температуру (18—20) °С (для альдегидсодержащих средств – (20—22) °С). При проведении экспериментов тест-изделия погружают в рабочие растворы таким образом, чтобы раствор полностью покрыл изделия (толщина слоя раствора над поверхностью изделий должна быть не менее 1 см) и заполнил все полости и каналы без воздушных пробок. Через определенные интервалы времени, зависящие от химического состава средства (от 5 до 30 мин), тест-изделия извлекают из раствора и помещают на 5 мин в раствор соответствующего нейтрализатора, проверенного на эффективнсоть. После этого тест-изделия переносят в пробирки с жидкой питательной средой (СПБ) с 0,5 % глюкозы. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 21 сут. Предварительный учет результатов осуществляют через 48—72 ч, а окончательный – на 21 сут. 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 ч. 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 ч при температуре (18—20) °С, и не более 3 ч при умеренно повышенной температуре (50 ± 1) °С.

10. Оценка результатов исследования спороцидной активности и эффективности дезинфицирующих, стерилизующих средств и их субстанций

Результаты исследований спороцидной активности и эффективности дезинфицирующих, стерилизующих средств и их субстанций оценивают согласно требованиям и критериям, указанным в соответствующих разделах данных методических указаний.

Требования и критерии оценки спороцидной активности и эффективности дезинфицирующих, стерилизующих средств и их субстанций зависят от цели проведенных исследований.

Требования к устойчивости спор тест-микроорганизмов к эталонным дезинфицирующим и стерилизующим средствам приведены в табл. 1 (п. 3.1).

Требования к спороцидной активности дезинфицирующих, стерилизующих средств и их субстанций определяют суспензионным методом (п 5.1) и методом батистовых тест-объектов (п. 5.2).

Критерии оценки эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании различных объектов, контаминированных спорами, изложены:

- *поверхностей* – п. 6.1;
- предметов ухода за больными и игрушек – п. 6.2;
- посуды столовой, лабораторной, из-под выделений – п. 6.3;
- изделий медицинского назначения (кроме эндоскопов) – п. 6.4.1;
- эндоскопов – п. 6.4.2;
- белья, одежды, спецодежды и других объектов из тканей – п. 6.5;
- одежды, обуви, постельных принадлежностей, мягких игрушек и других объектов камерным методом – п. 6.5.1;
- воды – п. 6.7;
- выделений (моча, кал, мокрота, кровь) – п. 6.8;
- медицинских отходов –п. 6.9.

Критерии оценки спороцидной активности дезинфицирующих средств при использовании в качестве тест-микроорганизмов *B. anthracis* изложены в разделе 7.

Критерии оценки спороцидной эффективности стерилизующих средств для стерилизации ИМН, включая эндоскопы, изложены:

- водяного насыщенного пара под избыточным давлением – п. 8.1,
- сухого горячего воздуха – п. 8.2;
- растворов химических стерилизующих средств – п. 8.3.

Критерий оценки спороцидной эффективности стерилизующих средств, предназначенных для дезинфекции высокого уровня эндоскопов (ДВУ), изложен в разделе 9.

11. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 31.03.99 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Федеральный закон от 10.01.02 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

3. «Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554.

4. Постановление Правительства Российской Федерации от 04.04.01 № 262 «О государственной регистрации отдельных видов продукции, представляющих потенциальную опасность для человека, а также отдельных видов продукции, впервые ввозимых на территорию Российской Федерации».

5. СП 3.1/3.2.558—96 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний».

6. СП 3.5.1378—03 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и осуществлению дезинфекционной деятельности».

7. СП 3.1.089—96, ВП 13.31320—96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных».

8. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

9. СП 1.3.000—06 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности)».

10. ОСТ-42-21-2—85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства, режимы». М., 1985 г.

11. Методические указания по определению устойчивости культур микроорганизмов, контаминирующих изделия медицинского назначения в условиях производства и эксплуатации, к стерилизующим агентам. Утв. МЗ СССР 29 марта 1985 г. № 28-6/7.

12. Методы испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности. Утв. МЗ РФ, 1998 г.

13. Инструкция по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств. Утв. МЗ СССР 06 мая 1968 г., № 739—68.

14. Методические указания по оценке дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания различных объектов и санитарной обработки людей. Утв. МЗ СССР 20 августа 1970 г. № 859—70.

15. МУ № 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.98.

12. Библиографические данные

1. Абрамова И. М., Готье Т. М. Изучение устойчивости спорообразующих культур к растворам перекиси водорода: Сб. науч. трудов. 1980. с. 37.

2. Абрамова И. М. Изучение спороцидной активности глутарового альдегида в зависимости от pH и температуры растворов // Основные направления развития науки и практики дезинфекционного дела: Сб научн. трудов. М., 1981. С. 46—48.

3. Абрамова И. М., Готье Т. М. Изучение устойчивости спорообразующих культур к растворам перекиси водорода и дезоксона. //Теория и практика дезинфекции и стерилизации: Сб. трудов. М., 1983. С. 40.

4. Абрамова И. М., Сукиасян А. Н., Копылова А. И. Спороцидная активность глутарового альдегида в зависимости от pH и температуры //Вопросы дезинфекции и стерилизации: Сб. научн. трудов. М.,1986. С. 58.

5. Алексеева М. И., Масленников М. И., Меграбян Е. А. Стерилизация и дезинфекция эндоскопической аппаратуры в лечебно-профилактических учреждениях //Основные направления развития науки и практики дезинфекционного дела: Сб. научн. трудов. М., 1986. С. 58—61.

6. Барсунова Э. М., Рубинов Г. Е., Соколова Н. Ф. Эффективность хлорицина, ДП-2, дезоксона при обеззараживании объектов, зараженных возбудителем сибирской язвы //Актуальные вопросы дезинфекции и стерилизации. М., 1984. С. 14—18.

7. Барсунова Э. М., Мартынова В. Ю., Перепелкина Н. В. Нейтральный гипохлорит кальция и натриевая соль ДХУК – новые средства для дезинфекции при сибирской язве //Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации. М., 1979. С. 16.

8. Гутерман Р. Л. Выбор и использование штамма *B. Licheniformis* G для контроля воздушного метода стерилизации изделий медицинского назначения //Актуальные вопросы дезинфекции и стерилизации: Материалы научной конференции, посвященной 90-летию проф. В. И. Вашкова, 15—17 декабря 1992 г., С. 134.

9. Гутерман Р. Л. Средства контроля работы паровых и воздушных стерилизаторов //Дезинфекционное дело. 1992. № 1. С. 18—22.

10. Журавлева В. И. Подбор и сравнительная оценка терморезистентности культур, используемых для контроля качества стерили-

зации //Материалы всесоюзной научной конференции. Волгоград, 1983. С. 41.

11. Кареев Н. В. Подбор бактериальной культуры для контроля эффективности газовой стерилизации //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб науч. трудов. М., 1974. № 23, С. 134.

12. Лебедева Н. С. Бактерицидные и спороцидные свойства калиевой соли дихлоризоциануровой кислоты //Труды ЦНИДИ. М., 1970. № 19. С. 135—139.

13. Леви М. И., Гутерман Р. Л., Пирятинский Л. Б. и др. Апробация биотестов для контроля стерилизаци //Гигиена и санитария. 1990. № 3. С. 68—69.

14. Мамоненко Л. Л., Гумерова Р. Н. Анализ международного сотрудничества, осуществляемого во ВНИИДиС в 1981—1985 гг. по тематике СЭВ //Основные направления дезинфекционного дела: Сб. научных трудов. М., 1987. С. 169—173.

15. Мельникова Г. Н., Нехорошева А. Г., Панин О. Г. Сравнительная устойчивость бактериальных спор к действию стерилизующих агентов //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1976. № 25. С. 141—145.

16. Мельникова Г. Н., Нехорошева А. Г. Изменение устойчивости у тест-культур при длительном хранении к действию химических агентов //Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации. М., 1977. № 26. С. 113—116.

17. Мельникова Г. Н., Панин О. Г. Сравнительная устойчивость музейных комплексов спор бацилл к действию некоторых дезинфицирующих и стерилизующих агентов //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1980. С. 46—50.

18. Овнанян Г. В. Устойчивость возбудителей раневых инфекций к физическим и химическим обеззараживающим агентам //Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1989. С. 50—51.

19. Рамкова Н. В., Мельникова Г. Н., Нехорошева А. Г. и др. Сравнительная устойчивость спорообразующих культур к стерилизующим агентам //Современные методы и средства методы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1978. С. 119—123.

20. Рамкова Н. В., Абрамова И. М., Рысина Э. М. Антимикробные и моющие свойства электрохимически активированных растворов, получаемых в установках «Редококс» //Современные методы и средства методы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1991. С. 42—46.

21. Соколова Н. Ф., Шумаева Ю. Г. Сравнительная устойчивость спор сибирской язвы, вакцинных штаммов, псевдоантракса и антракоида к различным дезинфицирующим средствам //Совре-

менные методы и средства методы дезинфекции и стерилизации //Труды ЦНИДИ. М., 1962. № 15. С. 58—66.

22. Соколова Н. Ф., Павловская Л. Г., Сравнительное изучение устойчивости спор некоторых штаммов микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пару //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Труды ВНИИДиС. М., 1971. Вып. 21, Т. 1. С. 58—66.

23. Соколова Н. Ф., Грачева М. Н., Барсунова Э. М. К вопросу о выборе тест-микробов для изучения спороцидной активности дезинфектантов. Проблемы дезинфекции и стерилизации //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1974. № 23. С. 26—29.

24. Соколова Н. Ф., Канищев В. В., Левчук Н. Н., Федорова Л. С. К вопросу об устойчивости споровых культур к дезинфицирующим средствам //VIII Межгосударственная научно-практическая конференция государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными заболеваниями в государствах-участниках СНГ» 25—26 сентября 2007 г.

25. Сукиасян А. Н., Абрамова И. М. Синтез и изучение спороцидной активности препарата на основе надмалеиновой кислоты //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1985. С. 63—69.

26. Сучков Ю. Г., Леви М. И., Бессонова В. Я. Новый термофильный штамм для бактериологического контроля паровой стерилизации. Сообщение I //Дезинфекционное дело. 1996. № 3. С. 28—32.

27. Федорова Л. С. Сравнительное изучение бактерицидной и спороцидной активности калиевой соли дихлоризоциануровой кислоты в чистом виде и в комплексе с хлористыми солями щелочных металлов //Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1978. № 27. С. 79—83.

28. Федорова Л. С. Бактерицидные и спороцидные свойства гипохлорита кальция нейтрального //Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. научных трудов. М., 1976. № 25. С. 114—119.

29. Методы исследования дезинфекционных, дезинсекционных и тератизационных препаратов /Под ред. проф. В. И. Вашкова. М.: Медгиз, 1961. 236 с.

30. DRAFT EUROPEAN STANDARD. CEN/TC 216. NORME EUROPEENNE WI 216042, 8 September 2003. English version. Chemical desinfectants and antiseptics – Application of European standards for chemical desinfectants and antiseptics.

31. EUROPAISCHE NORM. EN 14347. Marz 2005. Deutsche Fassung. Chemische Desinfectionmittel und and Antiseptika – Sporozide Wirkung (Basistest) – Prufverfahren und Anforderungen (Phase 1).

Приложение 1

Характеристика тест-микроорганизмов по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, присущим данному виду

1) ***Bacillus cereus*** (шт. 96). Подвижная грамположительная палочка; размер, мкм: длина – 3—5, ширина – 1,2. Температура роста (°С): минимальная – 10—20; оптимальная – (37 ± 1), максимальная – 35—45. Споры размером 0,8 × 1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположенные центрально. Аэроб. На МПБ (pH 7,3 ± 0,1) через 24 ч инкубирования образует крошковидный осадок и пристеночное кольцо, образует R-формы; на МПА (pH 7,3 ± 0,1) – круглые, сухие, белые, выпуклые колонии с неровным краем, размером 3—5 мм; продукты расщепления глюкозы: кислота, ацетон, газ не образуется. Окрашиваемость вегетативных клеток по Граму, спор – по Цилю-Нильсону. По классификации патогенных для человека микроорганизмов относится к IV группе патогенности.

Bacillus cereus (шт. 96) используют для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций на основе кислородсодержащих и хлорсодержащих ДВ.

Тест-микроорганизм *B. cereus* (штамм 96) хранится в музее Федерального государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

2) ***Geobacillus stearothermophilus*** (шт. ВКМ В-718), подвижная грамположительная термофильная палочка. Оптимальная температура роста (55 ± 1) °С, исключающая развитие других широко распространенных микроорганизмов. Споры эллиптические, расположенные центрально. Аэроб. На МПБ (pH 7,3 ± 0,1) через 24 ч инкубирования образует помутнение среды, на МПА (pH 7,3 ± 0,1) – слабо выпуклые колонии диаметром 2—4 мм, с ровным краем. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Ферментирует глюкозу с образованием кислоты; не ферментирует арабинозу, ксилозу и маннин. Гидролизует казеин. Не расщепляет фенилаланин и тирозин. Непатогенен для человека и животных.

G. stearothermophilus используют для исследования и оценки действия водяного насыщенного пара под избыточным давлением при стерилизации ИМН.

Тест-микроорганизм *G. stearothermophilus* (штамм ВКМ В-718) хранится в музее культур:

• Федерального государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18);

• Испытательного лабораторного центра (ГУП) «Московский городской центр дезинфекции» (129337, г. Москва, Ярославское шоссе, д. 9).

3) ***Bacillus licheniformis*** (шт. G BKM B-1711D): подвижная грамположительная палочка. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С. Споры эллиптические, расположенные центрально. Факультативный анаэроб. На МПБ (pH 7,3 ± 0,1) через 24 ч инкубирования образует помутнение среды, на поверхности – сухую пленку; на МПА (7,3 ± 0,1) – слабо выпуклые сухие колонии вытянутой звездчатой формы с неровными краями диаметром 4—6 мм, врастающие в питательную среду. Реакция Фогес-Проскауэра положительная. Ферментирует глюкозу с образованием кислоты и газа. Редуцирует нитраты, образует газ в среде для нитрификации в анаэробных условиях. Утилизирует пропинат. Гидролизует крахмал. Расщепляет аргинин. Не образует индол, лецитиназу, кислоту в лакмусовом молоке. Непатогенен для человека и животных.

Bacillus licheniformis (шт. G BKM B-1711D) используют для исследования и оценки спороцидной активности сухого горячего воздуха при стерилизации ИМН.

Тест-микроорганизм *B. licheniformis* (шт. G BKMB-1711D) хранится в музее культур:

• Федерального государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18);

• Испытательного лабораторного центра (ГУП) «Московский городской центр дезинфекции» (129337, г. Москва, Ярославское шоссе, д. 9).

4) ***Bacillus subtilis*** (шт. 7): подвижная грамположительная палочка размером 2—3 × 0,7—0,8 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 5—20, оптимальная – (37 ± 1); максимальная – 45—55. Споры размером 0,8 × 1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Аэроб. На жидких питательных средах образует пленку серовато-белого цвета; на плотной питательной среде образует R-форму, складчатые колонии телесного цвета с изрезанными краями размером 3 × 5 мм, легко снимающиеся петлей. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон, газ не образует. Окрашиваемость вегетативных клеток по Граму, спор – по Цилю-Нильсону.

Bacillus subtilis (шт. 7) используют для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций на основе альдегидсодержащих ДВ. Тест-микроорганизм *Bacillus subtilis* (шт. 7) хранится в музее культур Федерального государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

5) Вакцинный штамм ***B. anthracis*** СТИ-1 (pX01$^+$, pX01$^-$). Штамм СТИ-1 – это подвижная грамположительная палочка размером 3—5 × 1,0—1,2 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 15—20, оптимальная – 37 ± 1; максимальная – 40. Споры размером 0,8 × 1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Анаэроб, на жидких питательных средах растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, не вызывает помутнения; на плотной питательной среде образует R-формы, серовато-белые с ворсистым краем («львиная грива«), колонии размером 3—5 мм. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон, газ не образует; не разлагает арабинозу, рамнозу, маннозу, галактозу, рафинозу, лактозу, гекулин, маннит, дульцид, сорбит, инозит; не обладает гемолитической, фосфатазной, лицитиназной активностью; лизируется специфическим сибиреязвенным фагом; дает положительную реакцию с люминсцирующей адсорбированной сибиреязвенной сывороткой, чувствительна к воздействию сибиреязвенного фага и пенициллина, не вызывает гемолиза эритроцитов; при посеве на 5 % кровяной агар не коагулирует яичный желток.

Используют при изучении и оценке спороцидной активности ДС и их субстанций в виде сибиреязвенной живой вакцины СТИ-1 для людей, МТРУ-42 № 10, представляет собой живую споровую культуру сибиреязвенных вакцинных штаммов. Используют при изучении спороцидной активности ДС и их субстанций.

6) ***Bacillus anthracis***, шт. 81/1 (pX01$^+$, pX02$^+$) или 27 (pX01$^+$, pX02$^+$) – это подвижные грамположительные палочки размером 3—5 × 1,0—1,2 мкм. Температура роста, °С: минимальная – 15—20, оптимальная – 37 ± 1; максимальная – 40. Споры размером 0,8 × 1,2 мкм, эллиптической или цилиндрической формы, расположены центрально. Анаэроб, на жидкой питательной среде растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, не вызывает помутнения; на плотной питательной среде образует R-формы, серовато-белые с ворсистым краем («львиная грива«), колонии размером 3—5 мм. Разлагает глюкозу на кислоту, ацетон, газ не образует; не разлагает арабинозу, рамнозу, маннозу, галактозу, рафенозу, лактозу, гекулин, маннит, дульцид, сорбит, инозит; не обладает гемо-

литической, фосфатазной, лицитинозной активностью; лизируется специфическим сибиреязвенным фагом; дает положительную реакцию с люминисцирующей адсорбированной сибиреязвенной сывороткой.

Используют при изучении спороцидной эффективности ДС при обеззараживании различных объектов с применением биологического метода контроля.

Приложение 2

Методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микроорганизмов, предназначенных для изучения и оценки спороцидной активности ДС, СС и их субстанций

1. Агар Хоттингера

Мясной перевар по Хоттингеру (аминный азот от 140 до 160 мг %)	1 000 мл
Натрий хлористый	5,0 г
Агар	20,0 г
pH	7,3 ± 0,1

Мясной перевар по Хоттингеру разводят дистиллированной водой до содержания аминного азота от 140 до 160 мг %, добавляют хлористый натрий и агар, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного расплавления агара. Фильтруют и стерилизуют при температуре 120 °С в течение 30 мин.

2. Пшеничный агар

Пшеничная крупа «Артек» (или «Полтавская»)	500,0 г
Агар	25,0 г
Дистиллированная вода	1 000 мл
pH	7,3 ± 0,1

Пшеничную крупу «Артек« (или «Полтавская«) заливают дистиллированной водой. Через 18—24 ч настой аккуратно сливают, не выжимая, доводят до первоначального объема, добавляют агар и растапливают на водяной бане или в автоклаве (текучим паром 1 ч). Оставляют в теплом месте до осаждения осадка на 12 ч. Остывший агар выкладывают на противень и срезают осадок. Агар растапливают на водяной бане, постоянно помешивая. Устанавливают pH 7,3 ± 0,1. Разливают в бутылки, пробирки, матрацы (в зависимости от решаемых задач и целей). Стерилизуют текучим паром в аппарате Коха по 1 ч в течение 3 сут.

3. Картофельно-пептонный агар

Пептон	5,0 г
Мел	1,0 г
Агар	25,0 г
Картофельная вода	1 000 мл
pH	7,1 ± 0,1

Сырой картофель (из расчета 200 г очищенного картофеля на 1 л водопроводной воды) тщательно моют, очищают от кожуры и глазков, нарезают мелкими ломтиками, заливают водопроводной водой и кипятят 30 мин после закипания (молодой картофель употреблять нельзя). Отвар отстаивают и фильтруют в холодном состоянии через ватно-марлевй фильтр. Доводят объем фильтрата до первоначального. Устанавливают pH 7,1 ± 0,1. Добавляют пептон и агар. Нагревают, помешивая, до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, после чего добавляют мел. Разливают по флаконам, стерилизуют при 120 °С в течение 30 мин. После стерилизации среду во флаконах скашивают.

4. Мясопептонный агар

Методика приготовления изложена в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования« (под ред. М. О. Биргера. М.: Медицина, 1982).

5. Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой, НПО «Питательные среды», г. Махачкала (СПБ)

Питательный агар для культивирования микроорганизмов готовят согласно прописи на этикетке.

6. Бульон Хоттингера

Мясной перевар по Хоттингеру (аминный азот от 140 до 160) мг %	1 000 мл
Натрий хлористый	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
pH	7,3 ± 0,1

Мясной перевар по Хоттингеру разводят дистиллированной водой до содержания аминного азота от 140 до 160 мг %, добавляют хлористый натрий. Кипятят на слабом огне с закрытой крышкой 10 мин до полного растворения соли. Если есть выкипание, доводят объем до первоначального дистиллированной водой. Устанавливают pH 7,3 ± 0,1, кипятят повторно. Фильтруют, прибавляют глюкозу. Разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при 110 °С в течение 30 мин.

7. Мясопептонный бульон

Методика приготовления изложена в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» (под ред. М. О. Биргера. М.: Медицина, 1982). Для приготовления бульона с глюкозой добавить 0,5 % глюкозы.

8. Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, НПО «Питательные среды», г. Махачкала (США)

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов готовят согласно прописи на этикетке. Для приготовления бульона добавить глюкозу (0,5 %).

9. Цветная питательная среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов, сухой	Готовят согласно прописи на этикетке
Глюкоза	5 г
Бромкрезоловый пурпуровый спиртовой 1 %	2 мл
Дистиллированная вода	До 1 000 мл
pH	7,3 ± 0,1

В питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, приготовленный согласно прописи на этикетке, добавляют 5 г глюкозы, перемешивают до полного растворения последней, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и добавляют 2 мл 1 %-го спиртового раствора индикатора бромкрезолового пурпурового.

Устанавливают pH (7,3 ± 0,1) и разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин.

10. Цветная питательная среда с индикатором бромтимоловым синим

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов, сухой	Готовят согласно прописи на этикеке
Глюкоза	5 г
Бромтимоловый синий спиртовой 1 %	2 мл
Дистиллированная вода	До 1 000 мл
pH	7,3 ± 0,1

В питательный бульон для культивирования микроорганизмов (сухой), приготовленный согласно прописи на этикетке, добавляют 5 г глюкозы, перемешивают до полного растворения последней, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и добавляют 2 мл 1 %-го спиртового раствора индикатора бромтимолового синего. Устанавливают pH (7,3 ± 0,1) и разливают в стерильную посуду. Стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин.

Приложение 3

Материалы и оборудование, необходимые для проведения исследований суспензии спор тест-микроорганизмов

1. При определении концентрации спор в суспензии

Термостат суховоздушный ТС-80М . . . . ТУ 64-1-2622—75
баня водяная
Пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 см³
2-го класса точности . . . . . ГОСТ 20292—74
Дозаторы пипеточные
(фирмы «Bcoheat», Финляндия)
Пробирки химические . . . . . ГОСТ 10515—63
Чашки Петри . . . . . ГОСТ 25336—82
Спиртовка лабораторная . . . . . ГОСТ 25336—82
или газовая горелка
Спирт этиловый, ректификационный
технический . . . . . ГОСТ 18300—72
Электроплитка бытовая . . . . . ГОСТ 14919—83
Трубка медицинская резиновая . . . . . ГОСТ 3399—76
Зажимы пружинные для резиновых
трубок . . . . . ТУ 64-1-964—79
Спринцовка резиновая . . . . . ТУ 38.106-141—80
Штативы лабораторные химические . . . ТУ 48-0534-8—87
Вата медицинская гигроскопическая . . . ГОСТ 5556—81
Карандаш по стеклу . . . . . ТУ 46-22-904—78
Секундомер механический . . . . . ГОСТ 8.423—81
Термометры . . . . . ГОСТ 215—73
Стерильная питьевая вода
Питательные среды, приведенные
в прилож. 2

2. При определении устойчивости спор к текучему пару

Аппарат Ойль–Мюллера
Термостат суховоздушный ТС-80М . . . . ТУ 64-1-2622—75
Пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 см³
2-го класса точности . . . . . ГОСТ 20292—74
Пробирки химические . . . . . ГОСТ 10515—63
Чашки Петри . . . . . ГОСТ 25336—82
Спиртовка лабораторная . . . . . ГОСТ 25336—82
Батист или отбельная бязь

Спирт этиловый, ректификационный технический . . . . . ГОСТ 18300—72
Электроплитка бытовая . . . . . ГОСТ 14919—83
Трубка медицинская резиновая . . . . . ГОСТ 3399—76
Зажимы пружинные для резиновых трубок . . . . . ТУ 64-1-964—79
Спринцовка резиновая . . . . . ТУ 38.106-141—80
Штативы лабораторные химические . . . ТУ 48-0534-8—87
Вата медицинская гигроскопическая . . . ГОСТ 5556—81
Карандаш по стеклу . . . . . ТУ 46-22-904—78
Секундомер механический . . . . . ГОСТ 8.423—81
Термометры . . . . . ГОСТ 215—73
Дистиллированная вода . . . . . ГОСТ 6709—72
Мясо-пептонный бульон (МПБ). . . . . ВФС 42-366 ВС-92

3. При определении устойчивости спор к хлорамину, перекиси водорода, глутаровому альдегиду:

Баня лабораторная
Термостат суховоздушный ТС-80М . . . . ТУ 64-1-2622—75
Пипетки вместимостью 1,0 и 10,0 см³ 2-го класса точности . . . . . ГОСТ 20292—74
Пробирки химические. . . . . ГОСТ 10515—63
Стаканы химические 50—100 мл . . . . . ГОСТ 10515—63
Чашки Петри . . . . . ГОСТ 25336—82
Спиртовка лабораторная . . . . . ГОСТ 25336—82
Батист или отбельная бязь
Спирт этиловый, ректификационный технический . . . . . ГОСТ 18300—72
Электроплитка бытовая . . . . . ГОСТ 14919—83
Трубка медицинская резиновая . . . . . ГОСТ 3399—76
Зажимы пружинные для резиновых трубок . . . . . ТУ 64-1-964—79
Спринцовка резиновая . . . . . ТУ 38.106-141—80
Штативы лабораторные химические . . . ТУ 48-0534-8—87
Вата медицинская гигроскопическая . . . ГОСТ 5556—81
Карандаш по стеклу . . . . . ТУ 46-22-904—78
Секундомер механический . . . . . ГОСТ 8.423—81
Термометры . . . . . ГОСТ 215—73
Дистиллированная вода . . . . . ГОСТ 6709—72
Мясо-пептонный бульон (МПБ). . . . . ВФС 42-366 ВС-92
Хлорамин или перекись водорода
Тиосульфат натрия

Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств

МУ 3.5.2435—09

Редакторы Л. С. Кучурова, Е. В. Николаева
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 24.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,75
Тираж 500 экз. Заказ 105

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован отделом издательского обеспечения Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru