

ЗАТВЕРДЖЕНО

Наказ Міністерства охорони

здоров'я України

від 03 вересня 2020 р. № 2024

Методи проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці

I. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1. Ці Методи встановлюють вимоги до визначення специфічної активності (бактерицидна, фунгіцидна, мікобактерицидна, туберкулоцидна, спороцидна, віруліцидна, інсектицидна та родентицидна дії), безпечності, якості (ефективності) хімічних дезінфекційних засобів.

2. Отримані результати досліджень зазначеними Методами дозволяють робити екстраполяцію на дезінфекцію медичних виробів, предметів догляду за хворими, поверхонь санітарно-гігієнічного обладнання та апаратури, інших поверхонь, посуду, білизни тощо.

3. Ці Методи базуються на сучасних наукових знаннях, стандартах Європейського Союзу, методичних розробках країн Європейського Союзу. В них закладені умови досліджень та необхідна кількість обов'язкових контрольних дослідів, що дозволяє отримувати достовірну оцінку специфічної активності засобів, яка може бути відтворена лабораторіями. В свою чергу це дає можливість проводити об'єктивну порівняльну оцінку специфічної активності різних дезінфекційних засобів (далі – ДЗ).

4. Ці Методи поширюються на лабораторії будь-якої форми власності, що розташована в Україні або іншій країні, акредитовані на відповідність вимогам стандарту ISO/IEC 17025 (ДСТУ ISO/IEC 17025) та/або ISO/IEC 15189 (ДСТУ ISO/IEC 15189) Національним органом України з акредитації, іноземним органом з акредитації, який є повним членом ILAC (Міжнародної організації із співробітництва в галузі акредитації лабораторій), або іншим іноземним органом з акредитації, діяльність якого відповідає вимогам стандарту ISO/IEC 17011 (ДСТУ ISO/IEC 17011).

II. ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ, ФУНГІЦИДНОЇ, МІКОБАКТЕРИЦИДНОЇ, ТУБЕРКУЛОЦИДНОЇ, СПОРОЦИДНОЇ АКТИВНОСТЕЙ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ

1. Скорочення та аббревіатури

ДЗ – дезінфекційний засіб;

КУО – колонієутворююча одиниця;

РІ – рідина для інфікування;

t – час контакту;

Контрольні досліджувані суміші:

N – тест-суспензія (для антисептичних засобів та засобів для миття рук – кількість КУО/см³ до обробки засобом);

N₀ – кількість КУО/см³, в 10 раз менша, ніж в N;

N_v – валідаційна тест-суспензія,

N_{v0} – кількість КУО/см³, в 10 раз менша, ніж в N_v;

Na – дослідна суміш інтерферуєчої речовини, тест-суспензії N і розчину дезінфекційного засобу;

N_{дп} – кількість КУО/см³ після обробки досліджуваним засобом для миття або антисептики рук;

N_{еп} – кількість КУО/см³ після обробки еталонним засобом (калієвим милом або 60,0 % 1-пропанолом або 60,0 % 2-пропанолом);

N_w – тестова суміш у контролі води в досліді з носіями або при дезінфекції білизни в контролі без миючого і дезінфікуючого засобів;

N_п – вихідна концентрація тест-мікроорганізмів на бавовняних носіях (при дезінфекції білизни);

A (контроль експериментальних умов) – суміш інтерферуєчої речовини, N_v і жорсткої води (для готових до використання засобів (окрім засобів для миття рук) – води);

B (контроль відсутності токсичності нейтралізатора або фільтрації) – суміш нейтралізатора, води (або промивної рідини) та N_v;

C (контроль ефективності нейтралізації або валідація методу) – суміш інтерферуєчої речовини, розчинника, розчину засобу у найбільшій концентрації, яка використовується в досліді, та N_v;

об/об - дослідна концентрація виражена в одиницях об'єм на об'єм;

V_c – експериментальні дані, які записують як кількість КУО в тому чи іншому об'ємі проби:

у методі розбавлення-нейтралізації та досліді на носіях значення V_c у досліді та контролях – це кількість КУО в 1,0 см³ проби;

у методі мембранної фільтрації значення V_c у досліді, контролях B і C – це кількість КУО в 0,1 см³ проби, у контролі A – в 1,0 см³ проби; у модифікованому методі – 0,1 см³ для Na, 1,0 см³ для A та 0,01 см³ для B і C.

N, N_v, N₀, N_{v0}, Na, N_w, N_п, РІ, A, B, C – кількість клітин, підрахованих в 1,0 см³ у різних дослідних сумішах. Приклад – в нижченаведеній таблиці:

	Кількість клітин в $1,0 \text{ см}^3$ суспензій тест- мікроорганізмів	Кількість клітин в $1,0 \text{ см}^3$ у дослідних сумішах на початку експозиції	Кількість клітин, що вижили, в $1,0 \text{ см}^3$ у дослідних сумішах наприкінці експозиції t (А) або 5 хв (В) або 30 хв (С)
Дослід	N Тест-суспензія бактерій та грибів	Суспункту Метод $N_0^1 = N/10$ Дослід на носіях N/20	Na, Nw (перед нейтралізацією або фільтрацією)
Контролі	Nv, Nv_0 (валідаційні суспензії для контролів А, В, С)	$Nv_0^* = Nv/10$	А, В, С

Примітка. ¹ У випадку модифікованого методу $N_0^* = N/100$ та $Nv_0 = Nv/100$.

2. Умови дослідження та вимоги до активності дезінфекційних засобів

Дані Методи встановлюють вимоги та умови визначення специфічної активності (бактерицидна, фунгіцидна, мікобактерицидна, туберкулоцидна, спороцидна) хімічних дезінфекційних засобів в залежності від способу застосування (занурення, протирання, зрошення та замочування), а також методи визначення ефективності дії ДЗ при гігієнічній і хірургічній обробці рук. Встановлення ефективності специфічної активності ДЗ проводиться в експериментальних умовах в два етапи: кількісне визначення у суспензійному методі; якісне та кількісне визначення на носіях в умовах, наближених до практичного застосування.

Обов'язкові та додаткові умови дослідження та вимоги до активності засобів зазначені в нижченаведеній таблиці:

Умови дослідження та вимоги до активності засобів

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Температура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
Суспензійний метод		Обов'язкові умови дослідження			
бактерицидна активність (дезінфекційний засіб)	Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Enterococcus hirae ATCC 10541	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 % Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % плюс еритроцити барана 0,3 %	5,0
фунгіцидна активність	Candida albicans ATCC 10231 Aspergillus niger ATCC 16404	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²		4,0
Міко- бактерицидна активність туберкулоцидна активність	Mycobacterium avium ATCC 15769 Mycobacterium terrae ATCC 15755 Mycobacterium terrae ATCC 15755	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²		4,0
бактерицидна активність (засоби для гігієнічної та хірургічної обробки рук)	<i>Засоби для гігієнічної та хірургічної антисептики рук:</i> Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Escherichia coli K12 NCTC 10538 Enterococcus hirae ATCC 10541 Candida albicans ATCC 10231	(20,0 ± 1,0) °C	0,5 та 1 (засоби для гігієнічної антисептики та гігієнічного миття рук) 1, 3 та 5 (засоби для хірургічної антисептики та хірургічного миття рук)	Брудні умови (засоби для гігієнічного і хірургічного миття рук): бичачий альбумін 0,3 % плюс еритроцити барана 0,3 % Чисті умови (засоби для гігієнічної та хірургічної антисептики рук): бичачий альбумін 0,03 %	Бактерії - 5,0 C. albicans – 4,0 (засоби для антисептики рук)

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Темпера- тура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
	Засоби для гігієнічного та хірургічного миття рук: Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Escherichia coli K12 NCTC 10538 Enterococcus hirae ATCC 10541				3,0 (засоби для миття рук)
		Додаткові умови дослідження			
		Відповідно до інструкцій виробника, але не більше (30,0 ± 1,0) °C	Відповідно до інструкцій виробника, але не більше 1 (засоби для гігієнічної обробки) та 5 хв (засоби для хірургічної обробки)		
Спороцидна активність	Bacillus subtilis subsp.spizizenii ATCC 6633 Bacillus cereus ATCC 12826	(20,0 ± 1,0) °C	60, 120	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 %	4,0 ³
				Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % плюс еритроцити барана 0,3 %	
Знезараження медичного інструментарію (метод занурення)	Носії: скло, метал	Обов'язкові умови дослідження			
бактерицидна активність	Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Enterococcus hirae ATCC 10541	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 % Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % плюс	5,0
фунгіцидна активність	Candida albicans ATCC 10231 Aspergillus niger ATCC 16404	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²		4,0

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Темпера- тура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
міко- бактерицидна активність	Mycobacterium avium ATCC 15769 Mycobacterium terrae ATCC 15755	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²	еритроцити барана 0,3 %	4,0
туберкулоцидна активність	Mycobacterium terrae ATCC 15755				
Знезараження гумових шлангів	Носії: гумові шланги	Обов'язкові умови дослідження			
бактерицидна активність	Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Enterococcus hirae ATCC 10541	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²	До тест-суспензії додається 20 % дефібринована бараняча кров, до розчину засобу – 0,2 % бичачий альбумін	відсутність росту в досліді
фунгіцидна активність	Candida albicans ATCC 10231 Aspergillus niger ATCC 16404	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²		відсутність росту в досліді
міко- бактерицидна активність	Mycobacterium avium ATCC 15769 Mycobacterium terrae ATCC 15755	(20,0 ± 1,0) °C	60 ²		відсутність росту в досліді
туберкулоцидна активність	Mycobacterium terrae ATCC 15755				
Дезінфекція непористих поверхонь в практичних умовах (з або без механічного впливу)	Носії: керамічна плитка, скло, метал	Обов'язкові умови дослідження			
бактерицидна активність	Staphylococcus aureus ATCC 6538 Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 Enterococcus hirae ATCC 10541	від (20,0 ± 1,0) °C до (25,0 ± 1,0) °C	60 ²	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 %	5,0 ⁴
дріжджецидна активність	Candida albicans ATCC 10231			Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % + еритроцити барана 0,3 %	4,0 ⁴
		Додаткові умови дослідження			
фунгіцидна активність	Aspergillus niger ATCC 16404	від (20,0 ± 1,0) °C до (25,0 ± 1,0) °C	Відповідно до інструкцій виробника	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 %	4,0
міко- бактерицидна активність	Mycobacterium avium ATCC 15769 Mycobacterium terrae ATCC 15755			Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % плюс еритроцити барана 0,3 %	

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Температура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
Дезінфекція поверхонь в практичних умовах (необроблене дерево)	Носії: букові палички				
фунгіцидна активність	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	від (20,0 ± 1,0) °C до (25,0 ± 1,0) °C	60 ²	Чисті умови: бичачий альбумін 0,03 % Брудні умови: бичачий альбумін 0,3 % плюс еритроцити барана 0,3 %	Відсутність росту в досліді
Хімічна дезінфекція білизни (метод замочування)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 <i>Escherichia coli</i> K12 NCTC 10538 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Mycobacterium avium</i> ATCC 15769 <i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	від (12,0 ± 1,0) °C до (14,0 ± 1,0) °C	4, 6, 12 год або за рекомендаціями виробника	До тест-суспензії додається 20 % дефібринована бараняча кров До розчину засобу – 0,2 % бичачий альбумін	Відсутність росту в досліді
Термохімічна дезінфекція білизни					
бактерицидна активність	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	від (30,0 ± 1,0) °C до (60,0 ± 1,0) °C від (60,0 ± 1,0) °C та (>60,0 ± 1,0) °C	10, 15, 20	До тест-суспензії додається 20 % дефібринована бараняча кров До розчину засобу – 0,2 % бичачий альбумін	7
дріжджецидна активність	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	від (30,0 ± 1,0) °C до (60,0 ± 1,0) °C			6

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Температура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
	Додаткові умови дослідження				
Міко-бактерицидна активність	Mycobacterium avium ATCC 15769 Mycobacterium terrae ATCC 15755	від (30,0 ± 1,0) °C до (60,0 ± 1,0) °C	10, 15, 20	До тест-суспензії додається 20 % дефібринована бараняча кров До розчину засобу – 0,2 % бичачий альбумін	5
Метод для засобів гігієнічної та хірургічної обробки рук в умовах, наближених до практичних					
Ефективність засобів для гігієнічного миття рук	Escherichia coli K12 NCTC 10538	температура шкіри	0,5 або 1	немає	Більше, ніж для рідкого калієвого мила при митті 5мл/1 хв (p = 0,01)
Ефективність засобів для гігієнічної антисептики рук	Escherichia coli K12 NCTC 10538	температура шкіри	0,5 або 1	немає	Не менш, ніж для 60 % 2-пропанолу при n 2 x 3см ³ /0,5 хв кожні (p = 0,1)

Вид дослідження	Тест-мікроорганізми ¹	Температура, °C	Час контакту, хв	Інтерферуюча речовина	Редукція, lg
Ефективність засобів для хірургічної обробки рук	Нормальна мікрофлора шкіри	температура шкіри	Відповідно до інструкцій виробника, максимум 5 хв	немає	миттєва дія: не менш, ніж для 60,0 % 1-пропанола при $p = 2 \times 3 \text{ см}^3/3 \text{ хв}$ ($p = 0,1$) дія впродовж 3 год: не менш, ніж для 60,0 % 1-пропанола ($p = 0,01$) продовжена дія: більше, ніж для 60,0 % 1-пропанола ($p = 0,01$)

Примітки: ¹ див. додаток 1 “Перелік можливих тест-штамів”;

² з дослідницькою метою та за вимогою виробника деззасобу (заявника дослідження) можуть бути використані додаткові умови дослідження: збільшення або зменшення експозиції, наприклад, 5; 15; 30; 45; 120; 240 хв;

³ вказані вимоги не розповсюджуються на режими дезінфекції у вогнищах особливо небезпечних інфекцій, викликаних *B. anthracoides*;

⁴ за виключенням *P. aeruginosa* при 240 хв контакту (додаткова умова дослідження) – 4 lg та *C. albicans* при 240 хв контакту – 3 lg, якщо спостерігається зниження кількості мікроорганізмів у контролі.

3. Поживні середовища, реагенти, устаткування. Зберігання та приготування тест-мікроорганізмів для досліджень

Всі маси хімічних речовин вказані для безводних солей. Гідратовані форми можна використовувати як альтернативні, але при цьому необхідно перераховувати вагу відповідно до молекулярних мас цих сполук.

Реагенти повинні бути аналітичної якості і/або придатними для мікробіологічних досліджень, вільними від субстанцій, що є токсичними або інгібіторними для тест-мікроорганізмів. Для поліпшення відтворюваності методів рекомендується використовувати для приготування поживних середовищ комерційні дегідратовані складові. При приготуванні поживних середовищ необхідно суворо дотримуватися інструкцій виробника.

При використанні готових комерційних поживних середовищ, дозволених до застосування в Україні, їх склад повинен відповідати наведеному у підпункті 3.1.

Для кожного поживного середовища повинні бути проведені та задокументовані процедури валідації (при застосуванні альтернативних поживних середовищ) перевірки ростових властивостей та зафіксоване обмеження строку для використання.

При виникненні проблем з нейтралізацією до поживних середовищ можна додавати нейтралізатор (згідно додатку 2).

Поживні середовища стерилізують в автоклаві при температурі $(121,0 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ та тиску $(1,1 \pm 0,2) \text{ кгс/см}^2$ протягом 15 хв.

pH середовища потрібно вимірювати при $((20,0 - 25,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

Перелік схем дослідів визначення бактеріцидної, фунгіцидної, мікобактеріцидної, туберкулоцидної, спороцидної активностей дезінфекційних засобів надведено в додатку 3.

3.1. Поживні середовища та реагенти

Вода

Використовувати свіжоприготовлену дистильовану воду. Стерилізувати в автоклаві (згідно з підпунктом 3.2.).

Стерилізація не потрібна, якщо вода використовується, наприклад, для приготування поживних середовищ.

Якщо дистильована вода адекватної якості не доступна, то може використовуватися вода для ін'єкцій (згідно ЄФ або ДФУ).

Триптонно-соєвий агар (ТСА)

Триптон, панкреатичний гідролізат казеїну	15,0 г
Соєвий пептон, гідролізат муки соєвих бобів	5,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода (згідно з підпунктом 3.1.)	1000,0 см ³

ТСА з інгібітором

Для використання в методі визначення ефективності гігієнічної обробки рук до ТСА (згідно з підпунктом 3.1.) додається дезоксіхолат натрію ($C_{24}H_{31}NaO_4$).

Триптон, панкреатичний гідролізат казеїну	15,0 г
Соєвий пептон, гідролізат муки соєвих бобів	5,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0 г
Дезоксіхолат натрію ($C_{24}H_{31}NaO_4$)	0,5 г
Агар	15,0 г
Вода	1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища має бути $7,2 \pm 0,2$.

Триптонно-соєвий бульйон (ТСБ)

Триптон, панкреатичний гідролізат казеїну	17,0 г
Соєвий пептон, гідролізат муки соєвих бобів	3,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0 г
Вода	800,0 см ³
Калію дифосфат (K_2HPO_4)	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища має бути $7,2 \pm 0,2$.

Середовище Мідлбрука і Кона 7Н10 з 10,0 % збагаченням ОАДС (СМК) для мікобактерій

Порошок агару Мідлбрук 7Н10	19,0 г
Гліцерол ($C_3H_8O_3$) (згідно ЄФ)	5,0 см ³
Вода	до 900,0 см ³

Нагріти до кипіння для повного розчинення. Стерилізувати в автоклаві і остудити до температури від $(50,0 \pm 1,0) ^\circ C$ до $(55,0 \pm 1,0) ^\circ C$. В асептичних умовах додати 100,0 см³ добавки для збагачення Мідлбрук ОАДС. Розлити по чашках у кількості від 18,0 см³ до 20,0 см³. рН середовища повинне бути $6,6 \pm 0,2$.

Солодовий агар (СА) для грибків

Екстракт солоду	30,0 г
Соєвий пептон	3,0 г
Агар	15,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища повинне бути $5,6 \pm 0,2$.

Середовище Сабуро агар для грибків

Пептон (м'ясний або казеїновий)	10,0 г
Глюкози моногідрат	40,0 г
Агар	15,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища повинне бути $5,6 \pm 0,2$.

Солодовий бульйон (СБ) для грибків

Екстракт солоду	20,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища повинне бути $6,9 \pm 0,2$.

Бульйон Сабуро для грибків	
Пептон (м'ясний або казеїновий)	10,0 г
Глюкози моногідрат	40,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища повинне бути $5,6 \pm 0,2$.

Кріопротекторний розчин для бактерій, спороутворюючих бактерій, грибків

М'ясний яловичий екстракт	3,0 г
Триптон, панкреатичний гідролізат казеїну	5,0 г
Гліцерол (C ₃ H ₈ O ₃) (згідно ЄФ абоДФУ)	150,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Розчинити компоненти в киплячій воді. Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН середовища повинне бути $6,9 \pm 0,2$.

Бульйон Мідлбрук 7Н9 з 10,0 % збагаченням АДС і гліцеролом в якості відновника і кріопротекторного розчину для мікобактерій (МАДС)

Порошок бульйону Мідлбрук 7 Н 9	4,7 г
Гліцерол (C ₃ H ₈ O ₃) (згідно ЄФ абоДФУ)	100,0 г
Вода	750,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві протягом 10 хв і остудити до $(45,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. В асептичних умовах додати 100,0 см³ добавки для збагачення Мідлбрук АДС і стерильну воду до 1000,0 см³. рН середовища повинне бути $6,6 \pm 0,2$.

Розчин полісорбату 80 (Твін-80)

Полісорбат 80	0,5 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві.

Розчинник

Триптон, панкреатичний гідролізат казеїну	1,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	8,5 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації рН розчинника повинно бути $7,0 \pm 0,2$.

Рідина для промивання (для методу мембранної фільтрації)

Рідину для промивання (згідно з підпунктом 1 додатку 2) потрібно попередньо провалідувати для засобу, який досліджують. Вона повинна бути стерильною, сумісною з матеріалом мембранного фільтру і придатна до

ЄФфільтрації крізь мембранний фільтр в умовах дослідження.

Нейтралізатор

Нейтралізатор потрібно попередньо провалідувати (контроль С) для засобу, який досліджується. Нейтралізатор повинний бути стерильним.

Стерильна дефібринована бараняча кров

Жорстка вода для розбавлення засобу

Для приготування 1000,0 см³ жорсткої води застосовується наступна процедура.

Розчин А: розчинити 19,84 г безводного хлориду магнію (MgCl₂) або еквівалент водного хлориду магнію і 46,24 г безводного хлориду кальцію (CaCl₂) або еквівалент водного хлориду кальцію у воді і довести до 1000,0 см³. Стерилізувати в автоклаві. Зберігати розчин при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0)$ °C не більше 1 місяця.

Розчин Б: розчинити 35,02 г натрію бікарбонату (NaHCO₃) у воді і довести до 1000,0 см³. Стерилізувати мембранною фільтрацією (див. підпункт 3.2.). Зберігати розчин при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0)$ °C не більше 1 тижня.

Жорстка вода: для приготування 1000,0 см³ внести 600,0 – 700,0 см³ води у 1000,0 см³ мірну колбу і додати 6,0 см³ розчину А, потім 8,0 см³ розчину Б. Перемішати і довести до 1000,0 см³ водою. рН жорсткої води повинне бути $7,0 \pm 0,2$. Якщо необхідно, доведіть рН, використовуючи розчин приблизно 40 г/дм³ (близько 1 моль/дм³) гідроксиду натрію (NaOH) або приблизно 36,5 г/дм³ (близько 1 моль/дм³) хлористоводневої кислоти (HCl).

Жорстка вода повинна бути свіжоприготовленою в асептичних умовах і використана протягом 12 год.

Бичачий альбумін фракція V (такий, що підходить для мікробіологічних досліджень).

Інтерферуючі речовини

Інтерферуючу речовину варто вибирати відповідно до умов використання засобу. Інтерферуюча речовина повинна бути стерильною і готуватися в десятикратній концентрації відносно кінцевої концентрації в досліді.

Різновиди інтерферуючої речовини, які використовуються в досліді, надані нижче у підпункті 3.1.

Чисті умови (розчин бичачого альбуміну - низька концентрація)

Розчинити 0,3 г бичачого альбуміну у 100,0 см³ розчинника (згідно з підпунктом 3.1.).

Стерилізувати за допомогою мембранної фільтрації, зберігати в холодильнику при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0)$ °C і використати протягом

1 місяця.

Остаточна концентрація бичачого альбуміну для дослідів повинна складати 0,3 г/дм³ (0,03 %).

Брудні умови (розчин бичачого альбуміну - висока концентрація з баранячими еритроцитами)

Розчинити 3,0 г бичачого альбуміну у 97,0 см³ розчинника.

Стерилізувати за допомогою мембранної фільтрації.

Приготувати принаймні 8,0 см³ свіжої стерильної дефібринованої баранячої крові. Центрифугувати при 800 об/хв 10 хв. Після відкидання надосадової рідини ресуспендувати еритроцити в розчиннику. Повторити цю процедуру принаймні 3 рази, поки надосадова рідина не стане безбарвною.

Ресуспендувати 3,0 см³ осаджених баранячих еритроцитів у 97,0 см³ стерильного розчину бичачого альбуміну. Для попередження наступної контамінації цю суміш потрібно розділити на порції, що потрібні на 1 день, і зберігати в окремих ємкостях максимум 7 днів у холодильнику при температурі ((4,0 – 8,0) ± 1,0) °C.

Остаточна концентрація бичачого альбуміну й баранячих еритроцитів для дослідів повинна складати 0,3 % і 0,3 % відповідно.

Чисті та брудні умови для модифікованого методу для готових до використання засобів

Процедура аналогічна, описаній вище, але інтерферуюча речовина готується у п'ятикратній концентрації.

чисті умови: розчинити 1,5 г бичачого альбуміну у 100,0 см³ розчинника;

брудні умови: розчинити 15,0 г бичачого альбуміну у 85,0 см³ розчинника.

Приготувати принаймні 40,0 см³ свіжої стерильної дефібринованої баранячої крові. Далі згідно з підпунктом 3.1.

М'яке мило (калієве мило)

Для приготування 200,0 г/дм³ м'якого мила використовують:

Льняна олія 50 частин по вазі

Гідроокис калію (KOH) (згідно ЄФ) 9,5 частин по вазі

Етанол 96,0 % (C₂H₅OH) (згідно ЄФ) 7 частин по вазі

Вода скільки необхідно

Внести льняну олію в розчин гідроокису калію в 15 частинах дистильованої води і нагріти приблизно до (70,0 ± 1,0) °C при постійному помішуванні. Додати етанол і продовжувати нагрівання при помішуванні до завершення процесу омилення, зразок при цьому розчиняється повністю у воді і майже повністю в етанолі 96,0 %. Потім вагу рідкого мила довести до 100 частин додаванням гарячої води. Взяти 200,0 г рідкого мила в 1,0 дм³ воді і простерилізувати в автоклаві. рН мила повинно бути 10,0 - 11,0.

60,0 % 2-пропанол (52,3 % масова концентрація при (20,0 ± 1,0) °C

Додати 40,0 см³ води до 60,0 см³ 2-пропанолу.

Готувати ex tempore.

Внести у 1000,0 см³ мірну колбу з пробкою, яка розташована на вагах (точність зважування 0,1 г) 471,0 г 2-пропанолу з чистотою мінімум 99,5 %. Додати 429,0 г дистильованої води. Загальний об'єм буде складати приблизно 1000,0 см³. Закрити колбу скляною пробкою і ретельно перемішати вміст колби.

Цей розчин можна зберігати при кімнатній температурі у захищеному від світла місці необмежений час.

60,0 % 1-пропанол (об'ємна концентрація)

Внести у 100,0 см³ мірну колбу 48,0 г (= 60,0 см³) спирту з чистотою мінімум 99,5 %. Додати дистильовану воду до мітки на колбі. Закрити колбу скляною пробкою і ретельно перемішати вміст колби. Помістити колбу та ємкість з дистильованою водою на водяну баню, налаштовану на $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, на 30 хв для врівноваження температури. Додати необхідну кількість підігрітої на водяній бані дистильованої води та знову перемішати вміст колби.

Готувати *ex tempore*.

Кров'яний агар

Пептон	15,0 г
Печінковий перевар	2,5 г
Дріжджовий екстракт	5,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0 г
Агар	12,0 г
Вода	До 1000,0 см ³
Дефібринована стерильна бараняча кров	від 70,0 см ³ до 100,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві без додавання баранячої крові. Після стерилізації остудити середовище до температури від $(40,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ до $(50,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ і в асептичних умовах додати стерильну дефібриновану баранячу кров, ретельно перемішати. Розлити по чашках Петрі.

Споруляційний агар (агар з сульфатом марганцю)

Пептон	10,0 г
Дріжджовий екстракт	2,0 г
Сульфат марганцю (MnSO ₄)	0,04 г
Агар	15,0 г
Вода	До 1000,0 см ³

Стерилізувати в автоклаві. Після стерилізації розлити середовище по 150,0 см³ у флакони.

3.2. Устаткування

Необхідно стерилізувати весь скляний посуд і частини устаткування, які контактують з поживними середовищами та реагентами або пробами, за винятком тих, котрі поставляються стерильними, одним з наступних способів:

вологою парою, в автоклаві (згідно з підпунктом 3.2.);

сухим жаром, у сухожаровій шафі (згідно з підпунктом 3.2.).

Устаткування для стерилізації:

для стерилізації вологою парою застосовується автоклав, здатний підтримувати температуру $(121,0 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ та тиск $(1,1 \pm 0,2) \text{ кгс/см}^2$ протягом 15 хв;

для сухожарової стерилізації застосовується сухожарова шафа, яка здатна підтримувати температуру $(180,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ протягом 30 хв, $(170,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ протягом 60 хв або $(160,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ протягом 2 год.

Водяні бані, здатні підтримувати температуру від $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ до $(100,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

Термостат, здатний підтримувати температуру $(30,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, $(36,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

Холодильник, здатний підтримувати температуру $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, морозильна камера, яка здатна підтримувати температуру не вище $(- 70,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

рН-метр, який має похибку калібрування не більше, ніж $\pm 0,1$ одиниць рН при $((20,0 - 25,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Додаткова похибка електродів має бути не більше, ніж $\pm 0,1$ одиниць рН.

Секундомір

Електромеханічний змішувач, наприклад Vortex.

Апарат для мембранної фільтрації, виготовлений з корозійностійкого матеріалу з фільтроутримувачем об'ємом принаймні $50,0 \text{ см}^3$, придатними для використання фільтрів діаметром від 47 мм до 50 мм і розміром пор 0,22 мкм для стерилізації жорсткої води і бичачого альбуміну та 0,45 мкм для метода мембранної фільтрації. Джерело вакууму повинне давати однакову швидкість фільтрації. Для попередження занадто довгої фільтрації устаткування повинне бути так настроєне, щоб фільтрувати $100,0 \text{ см}^3$ промивної рідини зі швидкістю від 20 с до 40 с.

Ємності: пробірки, флакони, скляні стакани, скляні флакони або колби для культивування необхідного об'єму.

Градуйовані піпетки номінального об'єму 10,00; 1,00; 0,10; 0,01 см^3 . Можуть використовуватися калібровані автоматичні піпетки.

Чашки Петрі розміром від 90 мм до 100 мм.

Скляні гранули (діаметром від 3 мм до 4 мм).

Скляні гранули (діаметром від 0,25 мм до 0,5 мм).

Мірні колби.

Орбітальний механічний струшувач.

Колба Бунзена маленька зі скляною воронкою, що містить фільтр, виготовлений зі скляних часток, які спеклися, з розміром пор від 40 мкм до 100 мкм.

Центрифуга (800; 2000; 3000 об/хв).

Петлі (металеві або одноразові пластикові).

Циліндричні пластикові пробірки з ковпачками, які закручуються, місткістю біля $15,0 \text{ см}^3$, діаметр від 25 мм до 28 мм (для скляного та металевого носіїв).

Пробірки з конусоподібним дном та ковпачками, які закручуються, місткістю $50,0 \text{ см}^3$ (діаметром біля 28 мм).

Кріопробірки (для зберігання тест-мікроорганізмів при $(-70,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ об'ємом від $0,5 \text{ см}^3$ до $2,0 \text{ см}^3$).

Скляний шпатель.

Матові скляні носії (модель виробів медичного призначення), $15 \times 60 \times 1 \text{ мм}$, одна поверхня оброблена піском. Для підготовки скляні носії кип'ятять 10 хв у мильному розчині, промивають 3 рази водою і наприкінці один раз етанолом (70,0 %). Відмічають ділянку (горизонтальна довжина 10 мм) на одному кінці шорохуватої поверхні висушеного носія, близько 2 мм від трьох країв. Стерилізують у сухожаровій шафі. Після стерилізації відмічена "інокуляційна ділянка" повинна бути помітною.



Рис. 1. Матовий скляний (зліва) і металевий носії (зправа) з відміченою "інокуляційною ділянкою"

Гумові шланги (м'яка гума – мінералізована гумова суміш – просвіт 6 мм, товщина стінки – 2 мм, довжина – 10 мм). Для підготовки гумові шланги кип'ятять у бідистильованій воді протягом 10 хв двічі. Потім ретельно просушують у ламінарній шафі під потоком повітря і зберігають в закритій ємності, не допускаючи потрапляння пилу.

Пласкі дерев'яні палички (буковий шпон) розміром 5 мм х 20 мм х 2 мм. Для підготовки замочують у дистильованій воді протягом 24 год, висушують, потім стерилізують парою. Після стерилізації підсушують.

Металеві диски із нержавіючої сталі (модель виробів медичного призначення та поверхонь) діаметром 20 мм і товщиною від 1,2 мм до 1,5 мм. Для підготовки диски занурюють на 60 хв у мильний розчин. Мильний розчин змивають промиванням дисків за допомогою пінцета мінімум 10 с під проточною водопровідною водою і потім завершують промиванням дистильованою водою протягом ще 10 с. Поверхня не повинна висихати і не можна торкатися її руками. Необхідно забезпечити достатній напір води (мінімум 2000 см³/хв). Стерилізація дисків проводиться промиванням у 70,0 % ізопропанолі протягом 15 хв. Диски просушуються в ламінарній шафі під потоком повітря, потім зберігаються в закритій ємності, не допускаючи потрапляння пилу.

Плитка для операційних зі скляно-матовою поверхнею (ДСТУ БВ.2.7-117-2002), розміром 50 х 50 мм. Для підготовки плитку кип'ятять протягом 10 хв у мильному розчині, 3 рази промивають бідистильованою водою, потім 70,0 % етанолом. Після цього просушені тест-поверхні стерилізують у сухожаровій шафі і вносять у закриту ємність, не допускаючи потрапляння пилу.

Бавовняні носії розміром 1 см², ретельно промивають у дистильованій воді, висушують. Стерилізують в автоклаві. Після стерилізації підсушують.

Мікроскоп зі збільшенням не менше х 400.

Марля.

Скляна воронка.

3.3. Приготування розчинів дезінфекційного засобу для дослідження

Розчини дезінфекційного засобу готують на жорсткій воді (згідно з підпунктом 3.1.) у мінімум трьох різних концентраціях (дві концентрації – в активному діапазоні (передбачуваному чи відомому) і одна концентрація в неактивному діапазоні) (згідно з підпунктом 10.3).

Для дослідження засобу у суспензійному методі концентрація розчину засобу повинна бути в 1,25 більше бажаної дослідної концентрації тому, що він розбавляється до 80,0 % під час дослідження і валідації методу.

Готовий (нерозбавлений) засіб може використовуватися як один з досліджуваних розчинів засобу. У цьому випадку найбільша досліджувана концентрація в суспензійному методі складає 80,0 %. Якщо засіб, готовий до використання, тобто такий, що використовується без розбавлення, не демонструє бажану редукцію в досліді (згідно розділу 2), то може використовуватися модифікований метод (згідно з підпунктом 4.1.) для дослідження більш високої концентрації засобу (97,0 %).

Розбавлення засобів, готових до використання, готують на воді замість жорсткої води. Засоби для миття рук завжди попередньо розбавляють

жорсткою водою для одержання 62,5 % розчину. У випадку застосування модифікованого методу готують 51,0 % розчин. Ці розчини моделюють додавання водопровідної води на практиці і розглядаються як "засоби, готові до використання".

Що стосується твердих засобів, розчиняють вихідний засіб шляхом зважування щонайменше $1,0 \text{ г} \pm 10,0 \text{ мг}$ засобу в мірній колбі, і доводять необхідний об'єм жорсткою водою. Наступні розбавлення (менші концентрації) готують в мірних колбах на підставі об'ємного співвідношення у жорсткій воді.

Що стосується рідких засобів, то їх розбавлення готують у жорсткій воді в мірних колбах на підставі об'ємного співвідношення.

Розчини засобу готуються *ex tempore* і використовуються для дослідження протягом 2 год. Вони повинні утворювати фізично однорідний препарат, стабільний протягом усієї процедури. Якщо під час процедури з'явиться помітна неоднорідність внаслідок утворення осаду або пластівців (наприклад, внаслідок додавання інтерферуєчої речовини), то це потрібно занести до протоколу дослідження.

Концентрація засобу, зазначена в протоколі дослідження, буде бажаною дослідною концентрацією. Відмічають дослідну концентрацію в одиницях маси на об'єм або об'єм на об'єм і деталі, які стосуються проби отриманого засобу.

3.4. Приготування стандартних розчинів реагентів

Приготування стандартних розчинів глютарового альдегіду (ГА) та надоцтової кислоти (НОК), які використовуються для перевірки точності результатів визначення спороцидної дії:

для приготування 1,0 % стандартного розчину ГА розчиняють 2,5 г 50,0 % ГА та 0,25 г NaHCO_3 в $97,5 \text{ см}^3$ води. рН розчину повинно бути $7,6 \pm 0,2$;

для приготування 3,0 % стандартного розчину ГА розчиняють 7,5 г 50,0 % ГА та 0,75 г NaHCO_3 в $92,5 \text{ см}^3$ води. рН розчину повинно бути $7,6 \pm 0,2$;

для приготування 0,05 % стандартного розчину НОК розчиняють $0,25 \text{ см}^3$ 15,0 % НОК в $59,75 \text{ см}^3$ води. рН розчину повинно бути $3,2 \pm 0,2$;

для приготування 0,1 % стандартного розчину НОК розчиняють $0,5 \text{ см}^3$ 15,0 % НОК в $59,5 \text{ см}^3$ води. рН розчину повинно бути $3,1 \pm 0,2$.

15,0 % НОК – це водний розчин НОК (мінімум 15,0 % оцтової кислоти + максимум 24,0 % перекису водню + мінімум 16,0 % НОК + мінімум 40,0 % води). Зберігати при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

3.5. Методика посіву на щільні поживні середовища

Приготування і відбір кожної проби, внесення кожного інгредієнта вимагає ретельного перемішування електромеханічним (згідно з підпунктом 3.2.) або іншим способом для рівномірного розподілу мікроорганізмів у пробі.

Всі часові параметри обов'язково контролювати секундоміром.

Для посіву відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ кожного розбавлення в 2-х повторях і посіяти глибинним або поверхневим методом.

При використанні глибинного методу внести приблизно половину ($0,5 \text{ см}^3$) кожної проби в окремі чашки (2 повтори = 4 чашки) і додати від $15,0 \text{ см}^3$ до $20,0 \text{ см}^3$ розплавленого відповідного поживного середовища, охолодженого до $(45,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

При використанні поверхневого методу розподілити $1,0 \text{ см}^3$ проби, розділений на приблизно рівні кількості в підходящу кількість чашок (2 повтори = не менше 4 чашок) на висушену поверхню чашок, що містять відповідне поживне середовище.

3.6. Зберігання та приготування тест-мікроорганізмів для досліджень

Підготовка тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae* та *Escherichia coli*

Схеми зберігання та відновлення бактерій надані у додатках 4-27.

Відновлення ліофілізованих тест-мікроорганізмів

У ліофілізований зразок тест-мікроорганізму додати близько $1,0 \text{ см}^3$ ТСБ (згідно з підпунктом 3.1.). Розчинити цю суспензію в $5,0 \text{ см}^3$ ТСБ і перемішати до одержання гомогенної суміші принаймні 30 с.

Інокулювати 2 чашки з ТСА цією суспензією - на одну чашку максимум $0,1 \text{ см}^3$, на іншу - петлею для одержання ізолюваних колоній. Інкубувати при $(36,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Відібрати зразок ізолюваних колоній з чашки з ТСА для підтвердження чистоти й ідентичності тест-мікроорганізму. У дослідях використовують тільки чисті та ідентичні культури мікроорганізмів.

Приготування для зберігання

Додати розчин кріопротектору (згідно з підпунктом 3.1.) у кількості $10,0 \text{ см}^3$ на поверхню однієї або обох чашок ТСА, на яких є ріст культури, і ресуспендувати клітини скляним шпателем. Перенести у пробірку отриману суспензію клітин з поверхні ТСА і додати розчин кріопротектору до $10,0 \text{ см}^3$ або більше – в залежності від кількості, необхідної на 1 рік досліджень. Перемішати 30 с.

Негайно після перемішування внести по $0,5 \text{ см}^3$ отриманої суспензії у необхідну кількість кріопробірок.

Альтернативним способом зберігання культур мікроорганізмів є покриття гранул: внести піпеткою по $1,0 \text{ см}^3$ суспензії в кріопробірки, які містять 2 гранули (згідно з підпунктом 3.2.). Стряхнути пробірки для розподілу суспензії на поверхні гранул. Залишити на 30 хв при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Видалити надлишок кріопротекторного розчину піпеткою.

Розмістити кріопробірки при температурі $(-70,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або менше на максимум 14 місяців. Дозволяється зберігати більший період, протягом якого встановлена достатня життєздатність та незмінність властивостей тест-мікроорганізмів.

Викинути всі кріопробірки з бактеріями, якщо не підтвердилися чистота та ідентичність культур за допомогою загальноприйнятих методів.

Приготування вихідної культури

Розморозити кріопробірку або одну гранулу з кріопробірки при кімнатній температурі. Інокулювати чашку(и) або пробірку(и) зі скошеним середовищем

з ТСА цією суспензією/гранулою та інкубувати при $(36,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Використовувати отриману культуру як вихідну і зберігати не більше 9 тижнів у холодильнику при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ (*P. aeruginosa* не більше 6 тижнів). З цих вихідних культур готують робочі культури.

Приготування робочих культур тест-мікроорганізмів

Для приготування робочих культур необхідно попередньо зробити два чи три пересіва (пасажі) з вихідної культури тест-мікроорганізма наступним чином: виконують посів штрихом з вихідної культури принаймні на 2 чашки з ТСА та інкубують. Через 18 - 24 год роблять другий пересів з першого тим же способом та інкубують 18 - 24 год. З цієї другої культури роблять третій пересів тим же способом.

Другий і/або третій пасажі культури є робочими.

Для *E.coli* тільки перший пасаж культури є робочим (згідно з підпунктом 9.1.).

Якщо немає можливості приготувати другу культуру на визначений день, то можна використати попередню 48-годинну культуру для наступного пересіву за умови зберігання культури протягом 48 год у термостаті. Ніколи не робіть і не використовуйте культуру з четвертого пересіву.

Приготування тест-суспензії N для проведення досліджень

10,0 см³ розчинника внести в 100,0 см³ флакон з 5,0 г скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.). Відібрати робочу культуру за допомогою петлі і перенести клітини в розчинник.

Клітини потрібно суспендувати у розчиннику шляхом занурення петлі у розчинник і розтирання її об стінку колби для зняття клітин. Струшувати колбу протягом 3 хв, використовуючи електромеханічний струшувач, після чого перенести суспензію в пробірку.

Довести кількість клітин у суспензії до $1,5 \cdot 10^8 - 5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³, використовуючи розчинник (у випадку засобу, готового до застосування, – $1,5 \cdot 10^9 - 5,0 \cdot 10^9$ КУО/см³ та для всіх досліджень на носіях). Кількість КУО можна визначити будь-яким придатним способом. Залишити цю тестову суспензію при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ і використати протягом 2 год. Довести до температури, необхідної для дослідження, безпосередньо перед початком дослідження.

Для отримання необхідної кількості мікроорганізмів у суспензії рекомендується використовувати спектрофотометр або фотоколориметр (довжина хвилі близько 620 нм, кювета довжиною 10 мм). Кожна лабораторія повинна виконати калібрування для кожного тест-мікроорганізму, враховуючи, що потрібне значення оптичної густини знаходиться між 0,200 і 0,600. Для одержання відтворюваних результатів цього вимірювання може бути необхідним розбавити тест-суспензію N до 1:10 (наприклад, до 1,0 см³ тест-суспензії додати 9,0 см³ розчинника) і вимірювати густину саме цього розбавлення.

Для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення тест-суспензії 10^{-6} і 10^{-7} (10^{-7} і 10^{-8} для модифікованого методу та для всіх досліджень на носіях) з використанням розчинника.

Відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ кожного розбавлення в 2-х повторах і посіяти глибинним або поверхневим методом (згідно з підпунктом 3.5).

Приготування валідаційної суспензії N_v

Розбавити тест-суспензію N розчинником для одержання валідаційної суспензії N_v $3,0 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^3 \text{ КУО/см}^3$ (біля $\frac{1}{4}$ ($1 + 3$) розбавлення 10^{-5} , а для всіх досліджень на носіях - біля $\frac{1}{4}$ ($1 + 3$) розбавлення 10^{-6}), яка використовується у контролях А, В та С.

При застосуванні модифікованого методу процедура така ж сама з кінцевим результатом $3,0 \cdot 10^3 - 1,6 \cdot 10^4 \text{ КУО/см}^3$.

Для визначення КУО в отриманій валідаційній суспензії необхідно підготувати розбавлення $N_v 10^{-1}$ (для модифікованого методу 10^{-2}) розчинником (розбавлення N_v обозначається як N_{v0}). Відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ у 2-х повторностях і посіяти глибинним або поверхневим методом на чашки з ТСА.

Підготовка тест-штамів *Mycobacterium avium* і *Mycobacterium terrae*

Схема зберігання та відновлення мікобактерій надана у додатку 5.

Процедура відновлення та зберігання тест-культур мікобактерій така ж сама, як у підпункті 3.6. за винятком поживних середовищ: використовувати МАДС (згідно з підпунктом 3.1.) в якості суспензійного середовища та кріопротектора, СМК (згідно з підпунктом 3.1.) - для культивування; воду – для розбавлення тест-мікроорганізмів. Всі посіви здійснювати поверхневим методом та інкубувати при $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ протягом 21 доби.

Вихідні культури готувати не потрібно.

Для приготування робочих культур використовувати культуру в кріопробірках або 1 гранулу з кріопробірки, засіяти якнайменше на 5 чашок з СМК, і вважати її за першу робочу культуру. В разі необхідності її використовують для приготування другої культури.

Перший і/або другий пасажі культури є робочими.

Приготування тест-суспензії N для проведення досліджень

За допомогою одноразової пластикової петлі (згідно з підпунктом 3.2.) без води перенести тест-мікроорганізм, принаймні, з 5-ти чашок з робочою культурою у конічну пластикову пробірку (згідно з підпунктом 3.2.), яка містить від 6,0 г до 7,0 г сухих скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.). Гомогенізувати тест-мікроорганізм шляхом струшування протягом 5 хв для його рівномірного розподілення по гранулам і на більшій частині внутрішньої поверхні пробірки. Додати $10,0 \text{ см}^3$ води по краплям (0,05; 0,1; 0,5; $1,0 \text{ см}^3$), при цьому після кожного додавання води струшувати загалом приблизно 15 хв. Залишити на 20 хв для відстоювання, а потім, не струшуючи пробірку, обережно відібрати надосадову рідину і перенести її у флакон;

Для підтвердження гомогенності отриманої суспензії тест-мікроорганізму зробити розбавлення 1:10, підготувати препарат “роздавлена крапля” і продивитися під мікроскопом.

Довести кількість клітин у суспензії до $1,5 \cdot 10^9 - 5,0 \cdot 10^9$ КУО/см³, використовуючи воду. Залишити цю тестову суспензію при дослідній температурі. Її можна використовувати протягом дня.

Значення оптичної густини тест-суспензії знаходиться між 0,500 і 1,300.

Для визначення кількості мікроорганізмів у тест-суспензії приготувати розбавлення 10^{-7} і 10^{-8} КУО/см³, використовуючи воду.

Приготування валідаційної суспензії Nv

Процедура приготування валідаційної суспензії Nv така ж сама, як у підпункті 3.6. за винятком:

розбавити тест-суспензію N водою для одержання $3,0 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³ (біля $\frac{1}{4} (1 + 3)$ розбавлення 10^{-6}).

Підготовка тест-штамів *Candida albicans* та *Aspergillus niger*

Схеми відновлення та зберігання тест-мікроорганізмів надані у додатках 6 та 7.

Відновлення ліофілізованих тест-мікроорганізмів

Всі етапи проводити згідно з підпунктом 3.6., але замість ТСБ і ТСА використовувати СБ, СА або Сабуро бульйон і Сабуро агар та інкубувати при $(30,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ від 42 год до 48 год для *C. albicans*, від 9 до 11 діб для *A. niger*.

C. albicans

Приготування для зберігання

Додати розчин полісорбату 80 (згідно з підпунктом 3.1.) на поверхню однієї або обох чашок з агаром ($10,0 \text{ см}^3$ на чашку) і ресуспендувати конідії в цьому розчині, використовуючи скляний шпатель або скляні гранули (згідно з підпунктом 3.2.). Перенести суспензію клітин з поверхні агару у колбу та струшувати з 5,0 г скляних гранул протягом 1 хв.

Профільтрувати суспензію крізь фільтр (згідно з підпунктом 3.2.) і перенести у пластикову конічну пробірку (згідно з підпунктом 3.2.) для наступного центрифугування при 2000 об/хв протягом 20 хв. Відкинути надосадову рідину. Повторно суспендувати конідії у розчині кріопротектору до $10,0 \text{ см}^3$ або більше в залежності від кількості, необхідної на 1 рік. Перемішати 30 с. Далі - як у підпункті 3.6.

Приготування вихідної культури

Процедура приготування вихідної культури така ж сама, як у підпункті 3.6.

Приготування робочих культур тест-мікроорганізмів

Для *C. albicans* див. підпункт 3.6. Для виготовлення робочої культури *C. albicans* необхідно мати ріст якнайменше на 2-х чашках або 6-ти пробірках зі скошеним середовищем.

Другий і/або третій пасажі культури є робочими.

Якщо немає можливості приготувати другий пасаж культури на визначений день, то може використовуватися попередня 72-годинна культура для наступного пересіву за умови зберігання культури протягом 72 год у термостаті.

Для приготування робочої культури *A. niger* використовувати тільки перший пасаж культури.

Приготування тест-суспензії N

Для *S. albicans* всі етапи проводити згідно з підпунктом 3.6. за винятком:

для суспензійного методу: довести кількість клітин у суспензії до $1,5 \cdot 10^7$ - $5,0 \cdot 10^7$ КУО/см³, для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення тест-суспензії 10^{-5} і 10^{-6} з використанням розчинника.

для метода дезінфекції медичного інструментарію та інших методів з використанням носіїв: довести кількість клітин у суспензії до $1,5 \cdot 10^8$ - $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³, для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення тест-суспензії 10^{-6} і 10^{-7} з використанням розчинника.

A. niger

Додати 10,0 см³ розчину полісорбату-80 на поверхню чашок з робочою культурою і суспендувати конідіоспори в цьому розчині, використовуючи скляний шпатель. Перенести суспензію клітин з поверхні агару у колбу та струшувати руками з 5,0 г скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.) протягом 1 хв. Суспензію профільтрувати крізь фільтр.

Відразу після підготовки і перед дослідом провести мікроскопічне дослідження при збільшенні $\times 400$ для того, щоб підтвердити відсутність фрагментів міцелію (перевірити не менше 10 полів зору).

Якщо є міцелій, то треба провести процедуру відмивання: внести профільтровану суспензію у центрифужні пробірки. Центрифугувати при 2000 об/хв протягом 20 хв. Конідіоспори відмити не менш 2-х разів шляхом ресуспендування у розчиннику з наступним центрифугуванням. Якщо міцелій все ще є, то процедуру відмивання повторити.

Для суспензійного методу: довести кількість спор у суспензії до $1,5 \cdot 10^7$ - $5,0 \cdot 10^7$ КУО/см³, підраховуючи кількість КУО будь-яким придатним методом. Для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення тест-суспензії 10^{-5} і 10^{-6} з використанням розчинника.

Для метода дезінфекції медичного інструментарію та інших методів з використанням носіїв: довести кількість спор у суспензії до $1,5 \cdot 10^8$ - $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³, підраховуючи кількість КУО будь-яким придатним методом; для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення тест-суспензії 10^{-6} і 10^{-7} з використанням розчинника.

Ця тест-суспензія може зберігатися не більше 2 діб при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Довести температуру до дослідної прямо перед початком процедури дослідження.

Рекомендується використовувати спеціальне устаткування для підрахунку

числа спор (наприклад, камера Горяєва).

Зважаючи на це кожна лабораторія повинна мати дані калібрування для встановлення зв'язку між підрахованими кількостями при використанні спеціальних пристроїв і абсолютними кількостями, отриманими методами глибинного та поверхневого посіву. Лабораторії з великим досвідом виявили, що краще співпадання для необхідного рівня валідації тоді, коли підрахунок спорової суспензії був на 10 – 50 % вище при використанні спеціальних пристроїв, ніж задана кількість.

Приготування валідаційної суспензії N_v

Розбавити тест-суспензію N розчинником для одержання $3,0 \cdot 10^2$ – $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³ (біля $\frac{1}{4}$ (1 + 3) розбавлення 10^{-4} (у суспензійному методі) та 10^{-5} (у методі дезінфекції медичного інструментарію).

Для визначення кількості мікроорганізмів підготувати 10^{-1} розбавлення розчинником. Відібрати 1,0 см³ у 2-х повторах і посіяти глибинним або поверхневим методом.

Підготовка бактеріальних спор *Bacillus subtilis* та *Bacillus cereus*

Зберігання та приготування вихідних культур тест-мікроорганізмів проводити згідно з підпунктом 3.6., але замість ТСА при отриманні вихідної культури використовувати кров'яний агар (згідно з підпунктом 3.1.).

Приготування робочих культур тест-мікроорганізмів (споруляція) – суспензії бактеріальних спор

Інокулювати 50,0 см³ ТСБ в 100,0 см³ флаконі однією окремою колонією вихідної культури (згідно з підпунктом 3.6.) та інкубувати протягом 24 год при $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

Цю попередню культуру в об'ємі 10 см³ перенести у флакон, який містить 150,0 см³ споруляційного агару (згідно з підпунктом 3.1.). Рідку культуру розподілити на поверхні агару за допомогою стерильних скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.), інкубувати у флаконах протягом 2 діб при $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ і потім ще інкубувати протягом 21 доби при $(30,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

Для збирання спор внести піпеткою 10,0 см³ води у флакон, змити спори і ресуспендувати за допомогою скляних гранул, які були залишені у флаконі. Відібрати суспензію і перенести у флакон об'ємом 100,0 см³. Знову внести ще 10,0 см³ води і повторити процедуру.

Зібрану суспензію очистити шляхом фільтрації крізь 2 шари стерильної марлі у стерильній воронці. Фільтрат внести у пробірку і центрифугувати протягом 30 хв при 3000 об/хв. Рідину відкинути, а осад суспендувати у 65,0 % 2-пропанолі (не більше 50,0 % від об'єму пробірки) для інактивації вегетативних клітин, які залишилися. Витримати протягом 3 год при $(20,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$. Розбавити 2-пропанол тією ж кількістю води і центрифугувати протягом 30 хв при 3000 об/хв. Рідину відкинути, а осад суспендувати у воді. Повторити відмивання та центрифугування 5 разів.

Для контролю чистоти зробити мазок суспензії (на $100,0 \text{ см}^3$ – 10 мазків) на предметному склі, пофарбувати згідно методу фарбування спор і подивитися під мікроскопом. Кількість вегетативних клітин, що залишилася, має не перевищувати 20,0 % на поле зору, у протилежному випадку суспензію необхідно знову профільтрувати і відмити, як описано вище, або викинути.

Довести кількість бактеріальних спор у суспензії до $> 10^9$ КУО/см³, використовуючи воду, підрахувати кількість КУО будь-яким підходящим способом. Перед використанням зберігати суспензію бактеріальних спор протягом 4 тижнів у холодильнику при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

Для підрахунку приготувати розбавлення суспензії 10^{-6} , 10^{-7} і 10^{-8} з використанням води.

Відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ кожного розбавлення в 2-х повторях і посіяти поверхневим методом на підходящу кількість підсушених чашок з кров'яним агаром. Допускається використання ТСА. Інкубувати чашки при $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ або $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом 4 - 7 діб.

Суспензію бактеріальних спор можна отримувати від комерційного постачальника чи іншої лабораторії, якщо вона була приготована згідно вищевказаного методу. В цьому випадку протягом 1 тижня після отримання має бути проведений і задокументований підрахунок спор та стійкість спор відносно стандартних речовин.

Бактеріальні спори треба зберігати у воді при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Суспензію бактеріальних спор необхідно проконтролювати на чутливість у відношенні стандартних розчинів глютарового альдегіду та надощтової кислоти перед початком серії дослідів з дезінфікуючим засобом та принаймні один раз на місяць при їх тривалому використанні. При зберіганні суспензії бактеріальних спор не можна відкривати між використанням.

Суспензія бактеріальних спор може зберігатися у холодильнику при температурі $((4,0 - 8,0) \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ роками, але рекомендується їх заміна кожні 2 роки новою приготовленою суспензією бактеріальних спор.

Приготування тест-суспензії N для проведення досліджень

Взяти пробірку з підготовленими бактеріальними спорами з холодильника та перевірити їх концентрацію будь-яким підходящим способом.

Розбавити суспензію спор, використовуючи воду, так, щоб отримати $1,5 \cdot 10^8 - 5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³. Для визначення кількості мікроорганізмів приготувати розбавлення суспензії 10^{-6} , 10^{-7} з використанням води. Відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ у 2-х повторностях і посіяти на ТСА глибинним або поверхневим методом. Для контролю чистоти суспензії бактеріальних спор замість ТСА можна використати кров'яний агар (посів поверхневим методом з розбавлення 10^{-7}).

Приготування валідаційної суспензії Nv

Розбавити тест-суспензію N водою для одержання валідаційної суспензії Nv $3,0 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³ (біля $\frac{1}{4}$ (1 + 3) розбавлення 10^{-5} , яка використовується у контролях А, В та С.

Для визначення КУО в отриманій валідаційній суспензії необхідно підготувати розбавлення $N_v 10^{-1}$, використовуючи воду (розбавлення N_v обозначається як N_{v0}). Відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ у 2-х повторностях і посіяти на підходящу кількість підсушених чашок з ТСА.

4. Суспензійний метод

У дослідах застосовувати такі ж середовища та умови культивування, як у підпункті 3.6 відповідно до кожного тест-штаму. Підрахунок отриманих результатів у всіх дослідах наданий у розділі 8.

Суспензійний метод використовується для встановлення бактерицидної, мікобактерицидної, фунгіцидної/дріжджецидної, спороцидної активності в лабораторних умовах, наближених до можливого застосування засобу.

Визначення специфічної активності засобу, що вивчається, у суспензійному методі, передус його подальшому вивченню в умовах, наближених до практичного застосування для дезінфекції виробів медичного призначення шляхом занурення та знезараження поверхонь протиранням, розпиленням та іншими способами, а також антисептичних засобів для гігієнічної та хірургічної обробки рук.

Принцип методу

Зразок представленого для дослідження засобу додається у відповідній концентрації до того чи іншого тест-мікроорганізму у розчині інтерферуючої речовини, яка моделює чисті та брудні умови застосування засобу. Ця суміш витримується при відповідній температурі та часі експозиції (згідно розділу 2). Наприкінці періоду експозиції відбирається зразок, мікробіоцидна і/або мікробіостатична дія в якому негайно нейтралізується встановленим методом та визначається кількість тест-мікроорганізмів, що вижили, у кожному зразку і підраховується редукція (ефективність).

Суспензійний метод може виконуватися у двох варіантах. Якщо дія засобу може бути нейтралізована встановленим нейтралізатором, то застосовується метод розбавлення-нейтралізації, а при неможливості знайти придатний нейтралізатор – метод мембранної фільтрації.

4.1. Визначення бактерицидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirae* і для деяких типів засобів – *E. coli* (згідно розділу 2).

Для кожного тест-мікроорганізму повинні готуватися дві різні суспензії – тест-суспензія N для проведення дослідження та валідаційна суспензія N_v для проведення контролів.

Зберігання, приготування вихідних і робочих тест-культур мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії N_v (згідно з підпунктом 3.6.).

Метод розбавлення-нейтралізації – процедура дослідження

Основою суспензійного методу є метод розбавлення-нейтралізації.

При визначенні специфічної дії будь-якого дезінфекційного засобу, перш за все, необхідно визначити нейтралізатор, який припиняє дію даного засобу. Для визначення придатного нейтралізатора необхідно провести валідацію методу розбавлення-нейтралізації (процедура як для контролю С), використовуючи нейтралізатор, обраний відповідно до лабораторного досвіду або опублікованих даних. Найбільш поширені нейтралізатори наведено у додатку 2.

Якщо обраний нейтралізатор не придатний, необхідно повторити валідацію, використовуючи альтернативний нейтралізатор, що містить полісорбат-80 (30,0 г/дм³), сапонін (30,0 г/дм³), L-гістидін (1,0 г/дм³), лецитин (3,0 г/дм³), тіосульфат натрію (5,0 г/дм³) в розчиннику, або у фосфатному буфері 0,0025 моль/дм³ (згідно додатку 2).

Якщо не вдалося підібрати ефективний нейтралізатор, то замість методу нейтралізації може використовуватися метод мембранної фільтрації з подальшим відмиванням фільтру промивною рідиною для зняття антимікробної дії (згідно з підпунктом 4.1.).

Досліди щодо нейтралізації і/або видалення бактерицидної і/або бактеріостатичної дії засобу треба валідувати тільки для найбільшої концентрації засобу – для кожного з тест-мікроорганізмів і для кожної умови дослідження (температура, експозиція, інтерферуюча речовина).

Всі контролю, які супроводжують дослідження (контроль експериментальних умов А, контроль відсутності токсичності нейтралізатору В або фільтрації і контроль ефективності нейтралізації С), виконувати одночасно з дослідом і з тим же нейтралізатором або промивною рідиною, які використовуються в експерименті.

Перед проведенням експерименту необхідно привести температуру всіх реагентів та суспензій до температури, при якій проводиться дослід (згідно розділу 2), використовуючи, наприклад, водяну баню, налаштовану на температуру дослідження.

Нейтралізатор або промивна рідина і вода повинні мати температуру $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

У випадку засобу, готового до застосування, вода повинна мати дослідну температуру.

Схеми методу та контролів надані у додатках 8, 9.

Визначення бактерицидних концентрацій На методом розбавлення - нейтралізації

Внести піпеткою 1,0 см³ інтерферуючої речовини (згідно з підпунктом 3.1.) у пробірку. Додати 1,0 см³ тест-суспензії N (згідно з підпунктом 3.6.) і залишити пробірку при обраній дослідній температурі (згідно розділу 2) на 2 хв $\pm$ 10 с. Наприкінці цього часу додати 8,0 см³ одного з досліджуваних розчинів засобу (згідно з підпунктом 3.3) – отримана суміш На - і поставити пробірку при обраній температурі, на обраний час експозиції t.

Наприкінці часу експозиції відібрати 1,0 см³ зразка суміші На і перенести у пробірку, яка містить 8,0 см³ нейтралізатора і 1,0 см³ води. Поставити пробірку при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на 5 хв $\pm$ 10 с. Після закінчення часу нейтралізації негайно відібрати

пробу $1,0 \text{ см}^3$ у двох повторях нейтралізованої суміші Na і зробити посів, використовуючи глибинний або поверхневий метод.

Додатково зробити розбавлення $\text{Na } 10^{-1}$, для чого треба внести $0,5 \text{ см}^3$ цієї суміші в пробірку, що містить $4,5 \text{ см}^3$ нейтралізатору. При дослідженні засобів для миття рук треба зробити ще одне розбавлення $\text{Na } 10^{-2}$ на нейтралізаторі. Відібрати двічі проби по $1,0 \text{ см}^3$ з кожної пробірки розбавлень і зробити посів.

Контроль експериментальних умов А (валідація обраних експериментальних умов або перевірка відсутності якої-небудь летальної дії на мікроорганізм в умовах досліду)

Відібрати піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ інтерферууючої речовини, яка використовується в досліді, і внести у пробірку. Додати $1,0 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv, яка містить $3,0 \cdot 10^3 - 1,6 \cdot 10^4 \text{ КУО/см}^3$ (згідно з підпунктом 3.6.) і залишити пробірку при температурі досліду на $2 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Наприкінці цього часу додати $8,0 \text{ см}^3$ жорсткої води – отримана суміш А. У випадку готових до використання засобів (окрім засобів для миття рук) замість жорсткої води використовувати воду. Залишити пробірку при температурі досліду на найбільший час контакту, який використовується в досліді.

Наприкінці t відібрати піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ суміші А у 2-х повторностях і провести посів згідно з підпунктом 3.5.

Контроль відсутності токсичності нейтралізатора В

Відібрати піпеткою $8,0 \text{ см}^3$ нейтралізатора, який використовується в досліді, у пробірку. Додати $1,0 \text{ см}^3$ води та $1,0 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.) - отримана суміш В. Залишити пробірки при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Наприкінці цього часу відібрати $1,0 \text{ см}^3$ суміші В у 2-х повторностях і провести посів.

Контроль ефективності нейтралізації С (валідація методу розбавлення-нейтралізації)

Відібрати піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ інтерферууючої речовини, яка використовується в досліді, у пробірку. Додати $1,0 \text{ см}^3$ розчинника і потім, увімкнувши секундомір, $8,0 \text{ см}^3$ розчину засобу у найбільшій концентрації і залишити пробірку при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на максимальний час t , який використовується в досліді.

Наприкінці t відібрати піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ суміші в пробірку з $8,0 \text{ см}^3$ нейтралізатора. Повторно виставити секундомір на початку внесення, перемішати і залишити пробірку при температурі $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Додати $1,0 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.) – отримана суміш С. Увімкнути секундомір на початку внесення, перемішати і залишити пробірку при температурі $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на $t \text{ } 30 \text{ хв} \pm 1 \text{ хв}$.

Наприкінці цього часу відібрати піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ отриманої суміші С у 2-х повторностях і провести посів.

Метод мембранної фільтрації, процедура дослідження

Схеми методу та контролів наведені у додатках 10, 11.

Визначення бактерицидних концентрацій Na методом розбавлення-нейтралізації

Проводити згідно з підпунктом 4.1. за винятком: наприкінці часу експозиції відібрати двічі по $0,1 \text{ см}^3$ ($0,001 \text{ см}^3$ при дослідженні засобів для миття рук) зразка тест-суміші Na і профільтрувати кожну пробу окремо крізь мембранний фільтр (розмір пор $0,45 \text{ мкм}$).

При фільтрації малих об'ємів ($1,0 \text{ см}^3$ та менше) на фільтр попередньо вносять $10,0 \text{ см}^3$ промивної рідини чи води.

Для усунення дії засобу необхідно профільтрувати мінімум $150,0 \text{ см}^3$, але не більш ніж $500,0 \text{ см}^3$ промивної рідини. Якщо промивна рідина - не вода, то закінчити процедуру промиванням $50,0 \text{ см}^3$ води. Потім перенести кожний фільтр на поверхні окремих чашок із ТСА.

Контроль експериментальних умов А (валідація обраних експериментальних умов або перевірка відсутності якої-небудь летальної дії в умовах досліду)

Проводити згідно з підпунктом 4.1. за винятком: наприкінці часу експозиції відібрати двічі по $1,0 \text{ см}^3$ зразка суміші А і профільтрувати кожен $1,0 \text{ см}^3$ зразка в окремих апаратах для мембранного фільтрування. Додатково після цього профільтрувати $50,0 \text{ см}^3$ води. Потім перенести кожний фільтр на поверхні окремих чашок із ТСА.

Контроль фільтрації В (валідація процедури фільтрації)

Відібрати двічі по $0,1 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.) і перенести в окремі апарати для мембранного фільтрування і негайно профільтрувати як описано в підпункті 4.1.

Контроль С ефективності відмивання (нейтралізації) засобу (валідація методу мембранної фільтрації)

Проводити згідно з підпунктом 4.1. за винятком: наприкінці часу експозиції відібрати двічі по $0,1 \text{ см}^3$ зразка суміші С і профільтрувати кожен $0,1 \text{ см}^3$ в окремих апаратах для мембранного фільтрування. Промити фільтр промивною рідиною таким же чином як і в досліді, після цього профільтрувати $50,0 \text{ см}^3$ промивної рідини з додаванням $0,1 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.), відразу профільтрувати і закінчити процедуру промиванням $50,0 \text{ см}^3$ води. Потім перенести кожний фільтр на поверхні окремих чашок із ТСА.

Модифікований метод для готових до використання засобів

Якщо готовий до використання засіб досліджується згідно з підпунктом 4.1. і не показує необхідну редукцію (згідно розділу 2), то може застосовуватися модифікована процедура. Тест-суспензію N і валідаційну

суспензію Nv треба готувати в десятикратних концентраціях, а інтерферуючу речовину – в п'ятикратній концентрації.

Концентрація засобу у модифікованому методі складає 97,0%.

Метод розбавлення-нейтралізації

Нижче описані лише модифікації методу розбавлення-нейтралізації, викладені у підпункті 4.1.

Схеми дослідів та контролів наведені у додатках 12, 13.

Визначення бактерицидних концентрацій Na

Внести піпеткою $0,2 \text{ см}^3$ 5-кратної інтерферуючої речовини (згідно з підпунктом 3.1.) у пробірку. Додати $0,1 \text{ см}^3$ 10-кратної тест-суспензії (згідно з підпунктом 3.6.). Залишити пробірку при обраній дослідній температурі на $2 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Наприкінці цього часу додати $9,7 \text{ см}^3$ нерозбавленого розчину засобу (згідно з підпунктом 3.3). Увімкнути секундомір на початку додавання засобу і залишити пробірку при дослідній температурі на час експозиції.

Посів проб згідно з підпунктом 4.1.

Контроль експериментальних умов А (валідація обраних експериментальних умов та/або перевірка відсутності якої-небудь летальної дії в умовах дослідів)

Внести у пробірку піпеткою $0,2 \text{ см}^3$ 5-кратної інтерферуючої речовини. Додати $0,1 \text{ см}^3$ 10-кратної валідаційної суспензії і залишити пробірку при температурі дослідів на $2 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Наприкінці цього часу додати $9,7 \text{ см}^3$ води. При дослідженні засобів для миття рук замість води використовувати жорстку воду. Залишити пробірку при температурі дослідів на час експозиції; провести посів проб згідно з підпунктом 4.1.

Контроль відсутності токсичності нейтралізатора B

Відібрати піпеткою $8,8 \text{ см}^3$ нейтралізатора, який використовується в досліді, у пробірку. Додати $1,1 \text{ см}^3$ води та $0,1 \text{ см}^3$ 10-кратної валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.) і залишити при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$.

Просів проб згідно з підпунктом 4.1.

Контроль ефективності нейтралізації C (валідація методу розбавлення-нейтралізації)

Внести піпеткою $0,2 \text{ см}^3$ 5-кратної інтерферуючої речовини, яка використовується в досліді, у пробірку. Додати $0,1 \text{ см}^3$ розчинника і $9,7 \text{ см}^3$ нерозбавленого розчину засобу. Залишити пробірку при дослідній температурі на максимальний час t , який використовується у досліді.

Наприкінці t відібрати піпеткою $1,1 \text{ см}^3$ суміші в пробірку з $8,8 \text{ см}^3$ нейтралізатора, який використовують в досліді і залишити пробірку при температурі $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$. Додати $0,1 \text{ см}^3$ 10-кратної валідаційної

суспензії (згідно з підпунктом 3.6.1). Залишити пробірку при температурі $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на час контакту $30 \text{ хв} \pm 1 \text{ хв}$.

Посів проб згідно з підпунктом 4.1.

Метод мембранної фільтрації

Нижче описані лише модифікації методу мембранної фільтрації, викладеного в підпункті 4.1.

Схеми досліду та контролів наведені у додатках 14, 15.

Визначення бактерицидних концентрацій Na

Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Контроль експериментальних умов А (валідація обраних експериментальних умов або перевірка відсутності якої-небудь летальної дії в умовах досліду)

Процедуру постановки досліду проводити згідно з підпунктом 4.1., а фільтрація та посів проб згідно з підпунктом 4.1.

Контроль фільтрації В (валідації процедури фільтрації)

Відібрати двічі по $0,01 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.) і перенести в окремі апарати для мембранного фільтрування.

Посів проб згідно з підпунктом 4.1.

4.2. Контроль С ефективності відмивання (нейтралізації) засобу (валідація методу мембранної фільтрації)

Постановку досліду проводити згідно з підпунктом 4.1. за винятком: наприкінці часу експозиції відібрати двічі по $0,1 \text{ см}^3$ валідаційної суміші С і профільтрувати в окремих апаратах для мембранного фільтрування. Промити фільтр промивною рідиною таким же чином як і в досліді, після цього профільтрувати $50,0 \text{ см}^3$ води з додаванням $0,01 \text{ см}^3$ 10-кратної валідаційної суспензії Nv (згідно з підпунктом 3.6.). Додатково профільтрувати $50,0 \text{ см}^3$ води. Потім перенести кожний фільтр на поверхні окремих чашок із ТСА.

4.3. Визначення мікобактерицидної та туберкулоцидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів *M. avium* і *M. terrae* (згідно розділу 2).

Зберігання, приготування вихідних, робочих тест-культур мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії Nv проводити згідно з підпунктом 3.6.

Метод розбавлення-нейтралізації – процедура дослідження

Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Схеми досліду та контролів наведені у додатках 16, 17.

Визначення мікобактерицидних концентрацій Na методом розбавлення-нейтралізації

Метод виконувати згідно з підпунктом 4.1. Робити додаткове розбавлення суміші $Na\ 10^{-2}$ та 10^{-3} на нейтралізаторі.

Всі контролю (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію N_v (згідно з підпунктом 3.6.).

4.3 Визначення фунгіцидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів *A. niger*, *S. albicans* (згідно розділу 2).

Зберігання, приготування вихідних, робочих тест-культур мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії N_v проводити згідно з підпунктом 3.6.

Метод розбавлення-нейтралізації – процедура дослідження
Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Схеми досліду та контролів надані у додатках 18, 19.

Визначення фунгіцидних концентрацій Na методом розбавлення-нейтралізації

Проводити згідно з підпунктом 4.1., але використовувати тест-суспензію N згідно з підпунктом 3.6.

Всі контролю (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію N_v згідно з підпунктом 3.6.).

Метод мембранної фільтрації – процедура дослідження
Схеми досліду та контролів надані у додатках 20, 21.

Визначення фунгіцидних концентрацій Na . Процедуру постановки досліду проводити згідно з підпунктом 4.1., фільтрацію та посів проби проводити згідно з підпунктом 4.1.

Всі контролю (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу мембранної фільтрації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію N_v (згідно з підпунктом 3.6.).

4.4 Визначення спороцидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 та *B. cereus* ATCC 12826 (згідно розділу 2).

Зберігання, приготування вихідних культур тест-мікроорганізмів, суспензії бактеріальних спор, тест-суспензії N та валідаційної суспензії N_v проводити згідно з підпунктом 3.6.

Метод розбавлення-нейтралізації – процедура дослідження

Схема дослідження аналогічна схемі визначення фунгіцидних концентрацій і надана у додатках 18, 19.

Визначення спороцидних концентрацій На методом розбавлення-нейтралізації

Проводити згідно з підпунктом 4.1., але використовувати тест-суспензію N згідно з підпунктом 3.6.

Всі контролю (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію Nv, приготовлену згідно з підпунктом 3.6.

Контроль суспензії бактеріальних спор зі стандартними розчинами

Виконати процедуру згідно з підпунктом 4.1., використовуючи стандартні розчини глютарового альдегіду та надощової кислоти замість досліджуваного розчину. Підходящими нейтралізаторами є 20,0 г/дм³ гістидину для глютарового альдегіду та 10,0 г/дм³ тіосульфату натрію для надощової кислоти.

Результати визначення спороцидної активності оформлюються згідно з додатком 28.

5. Знезараження медичного інструментарію методом занурення

Цей метод призначений для встановлення наявності антимікробної активності хімічного дезінфекційного засобу, який використовується для дезінфекції виробів медичного призначення (хірургічні інструменти, матеріали для анестезії, ендоскопи та ін.), моделлю яких є скляні та металеві носії (згідно з підпунктом 3.2.).

В експерименті змодельовані умови, близькі до практичного застосування дезінфекційного засобу, а саме: відповідний тест-мікроорганізм, попереднє підсушування мікроорганізмів на носії, час контакту із засобом у відповідній концентрації інтерферуючої речовини, температура, тобто ті умови, які можуть впливати на дію дезінфекційного засобу на практиці.

Тест-мікроорганізми, що використовуються у досліді: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *C. albicans*, *A. niger*, *M. avium*, *M. terrae* (згідно розділу 2). Носії: скло та метал.

Використовується скло, яке оброблено піском для утворення шорхуватої поверхні, що ускладнює процес видалення мікроорганізмів. Це дає підставу екстраполювати отримані результати на обробку виробів з багатьох інших матеріалів.

Обов'язкові та додаткові умови дослідження наведені у розділі 2.

Принцип методу

Суспензія тест-мікроорганізмів у розчині інтерферуючої субстанції наноситься на той чи інший носій. Після висихання носій занурюється в розчин засобу і залишається при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на визначений термін контакту. Наприкінці часу контакту носій переноситься в нейтралізатор. Тест-мікроорганізми видаляються з поверхні шляхом струшування. Визначається

кількість тест-мікроорганізмів, що вижили, у кожній пробі і підраховується редуція.

5.1. Визначення бактерицидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*.

Зберігання, приготування вихідних і робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії Nv проводити згідно з підпунктом 3.6.

Процедура дослідження (метод занурення)

Схеми досліду та контролів надані у додатках 22, 23. Проводити згідно 4.1.

Інокуляція носіїв.

Піпеткою внести $1,0 \text{ см}^3$ інтерферуючої речовини (згідно з підпунктом 3.1.) у пробірку. Додати $9,0 \text{ см}^3$ тест-суспензії N, кількість клітин в якій становить від $1,5 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$ до $5,0 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$ (згідно з підпунктом 3.6.), піпеткою нанести $0,05 \text{ см}^3$ цієї суміші на "інокуляційну ділянку" носія і розподілити рівномірно усередині ділянки, наприклад за допомогою кінчика піпетки. Дати висохнути в термостаті до помітного висихання, максимум 60 хв. Використовувати носій відразу ж після висихання.

Занотувати час висихання в звіті.

Визначення бактерицидних концентрацій Na методом занурення, контроль води Nw:

Внести піпеткою $10,0 \text{ см}^3$ одного з розчинів засобу у пробірку (згідно з підпунктом 3.2.), розміщену при обраній температурі. Занурити інокульований носій відразу після висихання. Простежити, щоб інокульована ділянка цілком була занурена в розчин засобу. Увімкнути секундомір і залишити на обраний час контакту t – проба Na.

Наприкінці t перенести носій в іншу пробірку (згідно з підпунктом 3.2.) з $10,0 \text{ см}^3$ нейтралізатора і близько $1,0 \text{ г}$ скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.), розміщену при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Знову увімкнути секундомір і перемішати 15 с.

Після закінчення часу нейтралізації $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$ відібрати пробу $1,0 \text{ см}^3$ у двох повторностях і зробити посів. Додатково зробити розбавлення Na 10^{-1} , 10^{-2} та 10^{-3} на нейтралізаторі. Відібрати у двох повторностях проби по $1,0 \text{ см}^3$ з кожної пробірки розбавлення і зробити посів.

Виконати процедуру з іншими розчинами засобу у той же самий день.

Контроль води Nw: виконати вищевказані процедури, але замість розчину засобу внести $10,0 \text{ см}^3$ жорсткої води або (у випадку готових до використання засобів) води та зробити ще одне додаткове розбавлення нейтралізованої тест-суміші Nw 10^{-5} , яке використати для посіву та підрахунку.

Контроль води Nw ставити паралельно з дослідом для всіх часових параметрів.

Виконати процедуру для інших обов'язкових і, якщо потрібно, інших додаткових умов досліду.

Всі контролі (А, В, С) виконати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію Nv, яка містить $3,0 \cdot 10^3$ - $1,6 \cdot 10^4$ КУО/см³ (біля $\frac{1}{4}$ (1 + 3) розбавлення 10^{-6}).

5.2. Визначення мікобактерицидної та туберкулоцидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів: *M. avium*, *M. terrae*.

Зберігання, приготування вихідних і робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії Nv проводити згідно з підпунктом 3.6.

Процедура дослідження.

Схеми досліду та контролів надані у додатках 24, 25. Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Інокуляція носіїв. Проводити згідно з підпунктом 5.1.

Визначення мікобактерицидних концентрацій Na, контроль води Nw Проводити згідно з підпунктом 5.1. за винятком: зробити розбавлення нейтралізованої тест-суміші Nw 10^{-4} та 10^{-5} для посіву та підрахунку.

Всі контролі (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію Nv згідно з підпунктом 3.6.).

5.3. Визначення фунгіцидної активності

Дослідження проводити з використанням тест-мікроорганізмів: *C. albicans* і *A. niger*.

Зберігання, приготування вихідних і робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N, валідаційної суспензії Nv проводити згідно з підпунктом 3.6.

Процедура дослідження

Схеми досліду та контролів надані у додатках 26, 27. Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Інокуляція носіїв.

Проводити згідно з підпунктом 5.1., але (використовувати тест-суспензію N, кількість клітин в якій становить від $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³ до $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³ (згідно з підпунктом 3.6.).

Визначення фунгіцидних концентрацій Na методом розбавлення-нейтралізації, контроль води Nw

Проводити згідно з підпунктом 5.1. за винятком:
контроль води N_w : зробити розбавлення нейтралізованої тест-суміші $N_w 10^{-4}$ для посіву та підрахунку кількості мікроорганізмів.

Всі контролю (А, В, С) виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційну суспензію N_v , яка містить $3,0 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³ (біля $\frac{1}{4}$ ($1 + 3$) розбавлення 10^{-5}).

5.4. Знезараження гумових шлангів (якісне визначення)

Цей метод призначений для встановлення наявності антимікробної активності хімічного дезінфекуючого засобу, який використовується для дезінфекції гумових шлангів.

Дослідження проводиться з використанням тест-мікроорганізмів: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *C. albicans*, *A. niger*, *M. avium*, *M. terrae* (згідно розділу 2).

Принцип методу

Носії (гумові шланги) контамінують відповідною суспензією тест-мікроорганізмів (згідно розділу 2), висушують, вносять в ємкість і заливають розчином засобу на визначений термін експозиції. Наприкінці часу контакту носій переноситься в нейтралізатор. Тест-мікроорганізми видаляються з носіїв шляхом струшування. Визначається наявність чи відсутність росту тест-мікроорганізмів на поживному середовищі.

Зберігання та приготування вихідних, робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N , валідаційної суспензії N_v проводити згідно з підпунктом 3.6.

Процедура дослідження. Проводити згідно з підпунктом 4.1.

Інокуляція носіїв

Підготувати необхідний для дослідження об'єм суміші тест-суспензії та дефібринованої баранячої крові, кінцева концентрація якої має складати 20,0 % і занурити туди необхідну кількість носіїв (згідно з підпунктом 3.2.). Для забезпечення достатнього змочування та видалення пухирців повітря необхідно багаторазово перевертати носії пінцетом. Перенести на фільтрувальний папір у вертикальному положенні і дати висохнути в термостаті при $(36,0 \pm 1,0)$ °C протягом 4 год.

Визначення мікробіоцидних концентрацій N_a , контроль води N_w

До розчину засобу та жорсткої води, яка використовується для N_w , перед дослідженням додати бичачий альбумін в кінцевій концентрації 0,2 %.

Внести пінцетом носії (по 2 носії на тест-мікроорганізм для кожного часу контакту) для кожної концентрації засобу в ємкість і залити із розрахунку 2,5 см³ одного з розчинів засобу на один носій.

Для забезпечення достатнього змочування та видалення пухирців повітря необхідно багаторазово перевертати носії пінцетом. Увімкнути секундомір і залишити на обраний час експозиції.

Наприкінці t перенести по 2 носія в окремі пробірки з $10,0 \text{ см}^3$ відповідного рідкого середовища з нейтралізатором і близько $1,0 \text{ г}$ скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.), розміщені при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Знову увімкнути секундомір і промити 30 с.

Після нейтралізації носії за допомогою пінцета перенести в окремі пробірки з $10,0 \text{ см}^3$ відповідного середовища з нейтралізатором для інкубації, яка проводиться згідно з підпунктом 8.8.

Виконати процедуру з іншими розчинами засобу.

Подвійне використання відповідного середовища проводиться для усунення дії засобу методом розбавлення, при цьому це можна робити з додаванням нейтралізатора, що встановлюється при попередньому проведенні валідації метода розбавлення-нейтралізації (контроль С).

Контроль води N_w : виконати вищевикладену процедуру, але замість розчину засобу внести жорстку воду (з додаванням бичачого альбуміну) із розрахунку $2,5 \text{ см}^3$ на один носій. Контроль води N_w ставити паралельно з дослідом для максимального часового параметру.

Контроль ефективності нейтралізації С

Внести пінцетом носії (по 2 носії на тест-мікроорганізм) в ємкість і залити розчином засобу в найвищій концентрації, яка застосовується в досліді, із розрахунку $2,5 \text{ см}^3$ на один носій. Для забезпечення достатнього змочування та видалення пухирців повітря необхідно багаторазово перевертати носії пінцетом. Увімкнути секундомір і залишити на максимальній час контакту, що використовується в експерименті.

Наприкінці t перенести по 2 носія в окремі пробірки з $10,0 \text{ см}^3$ відповідного середовища з нейтралізатором і близько $1,0 \text{ г}$ скляних гранул (згідно з підпунктом 4.2.), розміщені при $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Знову увімкнути секундомір і промити 30 с.

Після нейтралізації носії за допомогою пінцета перенести в окремі пробірки з $10,0 \text{ см}^3$ відповідного середовища (при необхідності з нейтралізатором) для інкубації, куди додатково внести по одному гумовому шлангу, який контаміновано відповідним тест-мікроорганізмом. Цей дослід проводиться для підтвердження процесу нейтралізації.

Облік отриманих результатів проводити згідно з підпунктом 8.8.

Після завершення інкубації всі пробірки перевіряються на наявність росту. У пробірках з N_a він має бути відсутнім, а у пробірках з N_w та контролем С має спостерігатися ріст мікроорганізмів.

6. Методи знезараження білизни (хімічний та термохімічний)

Ці Методи призначені для встановлення наявності специфічної активності дезінфекційного засобу, який використовується для знезараження білизни в

умовах, наближених до практики.

Метод заснований на знезараженні засобом бавовняних лоскутів, які контаміновані тест-мікроорганізмами *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *E. coli*, *C. albicans*, *M. avium*, *M. terrae* (згідно розділу 2).

Метод включає наступні варіанти проведення дослідів.

Хімічний метод – застосовується при рекомендації виробника використовувати засіб способом замочування білизни;

Термохімічний метод – застосовується при рекомендації виробника використовувати засіб способом автоматичного прання білизни за допомогою пральної машини.

При застосуванні термохімічного методу при температурі $(60,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ і вище як тест-мікроорганізм використовують тільки *E. faecium* ATCC 6057.

6.1. Принцип методу

Носії (бавовняні лоскути) (згідно з підпунктом 3.2.) контамінують відповідною суспензією тест-мікроорганізмів (згідно розділу 2), висушують, вносять в ємкість і заливають розчином засобу при відповідній температурі (для хімічного методу – від $(12,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ до $(14,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, для термохімічного – згідно з рекомендаціями виробника) на визначений термін експозиції (згідно розділу 2). Наприкінці часу контакту носіїв переноситься в нейтралізатор. Тест-мікроорганізми видаляються з носіїв шляхом струшування. Визначається кількість тест-мікроорганізмів, що вижили, у кожній пробі і підраховується редукція.

6.2. Зберігання, приготування вихідних, робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N та валідаційної суспензії Nv
Проводити згідно з підпунктом 3.6.

6.3. Інокуляція носіїв

Підготувати необхідний для дослідження об'єм суміші тест-суспензії та дефібринованої баранячої крові, кінцева концентрація якої має складати 20,0 %. Для забезпечення достатнього змочування та видалення пухирців повітря необхідно багаторазово перевертати носії пінцетом. Перенести у відкриті чашки Петрі і дати висохнути в термостаті при $(36,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ протягом 3 год (максимальний термін при мінімальній вологості).

Провести контроль рівня зараження носіїв (Np) – визначити середнє значення концентрації тест-мікроорганізмів на 3-х носіях наступним чином: струшувати окремо заражені тест-мікроорганізмами носії в розчиннику протягом 10 хв, після чого для підрахунку приготувати розведення 10^{-7} і 10^{-8} (для *C. albicans* 10^{-6} і 10^{-7}) з використанням розчинника. Відібрати пробу $1,0 \text{ cm}^3$ кожного розведення в 2-х повторах і посіяти (згідно з підпунктом 3.5).

6.4. Визначення мікробіоцидних концентрацій Na, контроль води (Nw)
Проводити згідно з підпунктом 4.1. (в частині визначення нейтралізатора).

До розчину засобу та жорсткої води, яка використовується для Nw, перед дослідженням додати бичачий альбумін в кінцевій концентрації 0,2 %.

Внести пінцетом необхідну кількість носіїв (по 2 носії на тест-мікроорганізм для кожного часу контакту = 2 носії x 3 (4; 6 та 12 год або 10; 15 та 20 хв) = 6 носіїв для кожної концентрації засобу в ємність і залити 15,0 см³ одного з розчинів засобу, який має температуру досліду (для хімічного методу – від (12,0 ± 1,0) °C до (14,0 ± 1,0) °C, для термохімічного – згідно з рекомендаціями виробника) Ця температура має підтримуватися протягом всього часу контакту. Для забезпечення достатнього змочування та видалення пухирців повітря необхідно багаторазово перевертати носії пінцетом. Увімкнути секундомір і залишити на обраний час контакту t.

Наприкінці t перенести по 2 носія в окремі пробірки з 5,0 см³ ТСБ з нейтралізатором і близько 1,0 г скляних гранул (згідно з підпунктом 3.2.), розміщені при (20,0 ± 1,0) °C. Знову увімкнути секундомір і перемішати 10 хв ± 10 с.

Відібрати у двох повторях по 1,0 см³ проби і зробити посів. Додатково зробити розбавлення Na 10⁻¹, для чого внести 0,5 см³ цієї суміші в пробірку з 4,5 см³ ТСБ з нейтралізатором, перемішати.

Загальна кількість проб Na по 1,0 см³ для одного часового параметру і концентрації засобу має бути 8.

При застосуванні хімічного методу додатково перенести з пробірок 2 носія після нейтралізації на поверхні відповідних щільних поживних середовищ.

Виконати вищевказану процедуру з іншими розчинами засобу.

Контроль води Nw: виконати вищевказану процедуру, але замість розчину засобу внести 15,0 см³ жорсткої води (з бичачим альбуміном). Зробити розбавлення нейтралізованої тест-суміші Nw до 10⁻⁵ (для *C. albicans* до 10⁻⁴) для посіву та підрахунку.

6.5. Контроль ефективності нейтралізації С

Відібрати піпеткою 2,0 см³ дефібринованої баранячої крові, яка використовується в досліді, у пробірку. Додати, увімкнувши секундомір, 9,8 см³ розчину засобу у найбільшій концентрації з додаванням 0,2 % бичачого альбуміну, яка використовується в досліді. Залишити пробірку при (20,0 ± 1,0) °C на максимальний час t, який використовується в досліді.

Наприкінці t відібрати піпеткою 1,0 см³ суміші в пробірку з 8,0 см³ ТСБ з нейтралізатором. Повторно виставити секундомір на початку внесення, перемішати і залишити пробірку при температурі (20,0 ± 1,0) °C на 10 хв ± 10 с. Додати 1,0 см³ валідаційної суспензії Nv (згідно 6.2.) – отримана суміш С. Увімкнути секундомір на початку внесення, перемішати і залишити пробірку при температурі (20,0 ± 1,0) °C на t 30 хв ± 1 хв.

Наприкінці цього часу відібрати піпеткою 1,0 см³ отриманої суміші С у 2-х повторях і посіяти на відповідні поживні середовища.

7. Методи знезараження поверхонь

Ці Методи призначені для встановлення наявності специфічної активності дезінфекційного засобу, який використовується для знезараження поверхонь

методом протирання та нанесення на поверхню без механічного впливу (моделює спосіб зрошення) в умовах, наближених до практики. Моделлю поверхонь слугують носії: скло (згідно з підпунктом 3.2.), металеві диски (згідно з підпунктом 3.2.) та керамічна плитка з глянцевою поверхнею для операційних (згідно з підпунктом 3.2.). Знезараження поверхонь визначають відносно таких мікроорганізмів: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *C. albicans*, *A. niger*, *M. avium*, *M. terrae* (згідно розділу 2).

Також в цьому розділі надано метод встановлення фунгіцидної активності хімічних дезінфектантів на необробленому дереві відносно *A. niger* (для фізіотерапевтичних відділень, саун, лазень тощо), моделлю слугують плоскі дерев'яні палички (згідно з підпунктом 3.2.).

Принципи методів

При використанні як моделі поверхні скляних носіїв процедура дослідження аналогічна підпункту 5.2.

Метод протирання

Носії (керамічна плитка з глянцевою поверхнею для операційних) контамінують суспензією тест-мікроорганізмів (згідно розділу 2), висушують, наносять розчин засобу, розподіляючи його шпателем при температурі від $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ до $(25,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на час контакту. Наприкінці часу контакту носій переносять в нейтралізатор, який містить скляні гранули. Тест-мікроорганізми видаляють з поверхні носія шляхом струшування. Визначають кількість тест-мікроорганізмів, що вижили, у кожній пробі і підраховують редукцію.

Метод без механічного впливу

Носії (металеві диски, скло) контамінують суспензією тест-мікроорганізмів (згідно розділу 2), висушують, наносять піпеткою розчин засобу, так щоб повністю покрити тест-суспензію, і залишають при температурі від $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ до $(25,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на час контакту. Наприкінці часу контакту носій переносять в нейтралізатор, який містить скляні гранули. Тест-мікроорганізми видаляють з поверхні носія шляхом струшування. Визначають кількість тест-мікроорганізмів, що вижили, у кожній пробі і підраховують редукцію.

Метод визначення фунгіцидної активності на необробленому дереві

Носії (дерев'яні палички) контамінують суспензією *A. niger*, висушують, заливають розчином засобу, після чого виймають і залишають у вертикальному положенні на час контакту. Наприкінці часу контакту носій переносять в нейтралізатор і двічі промивають. Для визначення наявності росту тест-мікроорганізмів носії безпосередньо розміщують на поверхні щільного поживного середовища.

7.1. Підготовка суспензій тест-культур

Зберігання, приготування вихідних, робочих культур тест-мікроорганізмів, тест-суспензії N, валідаційної суспензії Nv проводити згідно з підпунктом 3.6.

7.2. Процедура дослідження

Проводити згідно з підпунктом 4.1. (в частині визначення нейтралізатора).

Під час дослідження всі поверхні потрібно тримати в горизонтальному положенні. У звіті варто вказати значення відносної вологості і температури ($20,0 \pm 1,0$) °C до ($25,0 \pm 1,0$) °C, виміряні в приміщенні, де проводиться дослідження.

7.3. Інокуляція носіїв.

Метод протирання: на поверхню носія (по 2 носія на тест-мікроорганізм окремо для кожного часу контакту і концентрації засобу) піпеткою нанести $0,1 \text{ см}^3$ тест-суспензії в інтерферууючій речовині (приготування: $1,0 \text{ см}^3$ інтерферууючої речовини + $9,0 \text{ см}^3$ тест-суспензії N) і рівномірно розподілити скляним шпателем (розмір шпателя 30 мм) по середній частині носія розміром 30 мм x 30 мм і залишити в термостаті при ($36,0 \pm 1,0$) °C до видимих ознак висихання (максимум 60 хв).

Метод без механічного впливу: на поверхню носія (по 2 носія на тест-мікроорганізм окремо для кожного часу контакту і концентрації засобу) піпеткою нанести $0,05 \text{ см}^3$ тест-суспензії в інтерферууючій речовині (приготування: $1,0 \text{ см}^3$ інтерферууючої речовини + $9,0 \text{ см}^3$ тест-суспензії N) і залишити в термостаті при ($36,0 \pm 1,0$) °C до видимих ознак висихання (максимум 60 хв).

Метод визначення активності відносно A. niger на необробленому дереві: по 2 носії залити тест-суспензією в інтерферууючій речовині (приготування: $1,0 \text{ см}^3$ інтерферууючої речовини + $9,0 \text{ см}^3$ тест-суспензії N) і витримати 10 хв, після чого носії розкласти на фільтрувальному папері і просушити в термостаті при температурі ($36,0 \pm 1,0$) °C протягом 60 хв.

7.4. Визначення мікробіоцидних концентрацій Na, контроль води Nw

Метод протирання: після висихання на носіях суспензій мікроорганізмів поверхні обробити $0,2 \text{ см}^3$ розчину засобу за допомогою його розподілу скляним шпателем по поверхні.

Після закінчення терміну контакту (згідно розділу 2) для визначення кількості життєздатних тест-мікроорганізмів поверхні внести у ємність підходящого діаметру (наприклад, скляний стакан або чашка Петрі) що містить $10,0 \text{ см}^3$ ТСБ (з нейтралізатором) і скляні гранули (згідно з підпунктом 3.2.). Видалення з поверхні здійснювати шляхом струшування (згідно з підпунктом 3.2.) протягом 2 хв.

Через 5 хв нейтралізації приготувати з нейтралізованої суміші Na розведення 10^{-1} на розчиннику. Поверхневим методом виконати посів у двох повторях по $0,5$ і $0,1 \text{ см}^3$ з нейтралізованої суміші Na і $0,1 \text{ см}^3$ з розведення 10^{-1} на відповідні щільні поживні середовища.

Метод без механічного впливу: після висихання на носіях суспензій мікроорганізмів на поверхню нанести $0,1 \text{ см}^3$ розчину засобу так, щоб покрити

повністю всю площу з нанесеною культурою. Після закінчення терміну контакту дослідження проводити згідно з підпунктом 7.4.

Метод визначення фунгіцидної активності на необробленому дереві: заражені і просушені носії помістити у скляні чашки, залити $15,0 \text{ см}^3$ розчину засобу (два носії тест-мікроорганізму на кожну концентрацію і час контакту), струсити їх, а через 2 хв вийняти з чашок. Потім носії поставити вертикально в невеликих скляних ємкостях, спираючи на стінки на час контакту.

Після закінчення часу контакту носії двічі промити у СБ чи у Сабуро бульйоні (з нейтралізатором). Пінцетом по 2 носія перенести в пробірки зі скошеним середовищем з СА чи Сабуро агаром і рухати їх по середовищу. Після зараження поверхні середовища один з носіїв повинний лежати безпосередньо над конденсатом води, а інший – в пробірці по середині поверхні середовища.

Виконати процедуру, використовуючи інші розчини засобу у той же самий час.

Контроль води Nw: виконати вищевказані процедури для найбільшого часу контакту, але замість розчину засобу використовувати жорстку воду. Зробити розбавлення нейтралізованої тест-суміші Nw 10^{-3} та 10^{-4} (для *S. albicans*, *A. niger* 10^{-2} та 10^{-3}) для інкубації та підрахунку. Для *A. niger* на букових паличках розбавлення не робити, а розмістити носії безпосередньо на поверхню СА чи Сабуро агара.

7.5. Контроль С виконувати відповідно з контролями для методу розбавлення-нейтралізації (згідно з підпунктом 4.1.), але використовувати валідаційні суспензії Nv згідно з підпунктом 3.6. та ТСБ з нейтралізатором за винятком: наприкінці t відібрати піпеткою $0,1 \text{ см}^3$ суміші в пробірку з $8,9 \text{ см}^3$ ТСБ з нейтралізатором. Після $5 \text{ хв} \pm 10 \text{ с}$ нейтралізації додати $1,0 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії Nv і залишити пробірку при температурі $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ на час контакту $30 \text{ хв} \pm 1 \text{ хв}$.

8. Облік результатів та підрахунки

8.1. Облік бактерицидної активності дезінфекційних засобів у суспензійному методі

Інкубувати чашки при $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ від 20 год до 24 год. Відкинути ті чашки, на яких неможливо зробити облік (з будь-якої причини). Підрахувати чашки і визначити кількість КУО для кожної чашки. Інкубувати чашки ще від 20 год до 24 год. Не враховувати чашки, на яких не видно окремих колоній. Знову врахувати чашки, що залишилися. Якщо кількість збільшилася, то для подальшої оцінки використовувати тільки їх більшу кількість.

Записати для кожної чашки підраховану кількість колоній (V_c), але записати >330 для будь-якого числа, що вище 330 і визначити значення V_c згідно з підпунктом 8.1.

Облік результатів та підрахунки

Першим кроком в обчисленні є визначення значень V_c , другим – N_0 , N , N_a , N_{vo} , N_v , A , B і C . Третій крок - це обчислення редукції R (згідно з підпунктом 10.1).

Визначення значень V_c (експериментальні дані)

Звичайні межі для підрахунку бактерій на чашках з агаром – 15 - 300 колоній. Припустимим вважати відхилення 10,0 %, тому межа складає 14 і 330. Для обліку на мембранних фільтрах зазвичай вища межа інша: 150, а з урахуванням 10,0 % відхилення – 165, нижня – також 15, а з урахуванням 10,0 % відхилення – 14.

Нижня межа (14) базується на тому факті, що, чим менша кількість, яка підрахована в пробі ($1,0 \text{ см}^3$), тим більше варіабельність, і, отже, підрахунок меншої кількості може привести до неправильних результатів. Нижня межа відноситься тільки до проби (а не до обліку на одній чашці). Наприклад, три чашки на $1,0 \text{ см}^3$ проби з 3, 8 та 5 КУО дають значення V_c 16, яке враховується.

Встановлення вищої межі (330 і 165) обумовлено можливим впливом більш густого росту колоній, пригнічення росту через вичерпання поживних речовин. Це відноситься тільки до обліку на одній чашці, а не до проби.

Відповідно до числа чашок, використаних на $1,0 \text{ см}^3$ проби, підраховують і записують значення V_c для підрахунку тест-суспензії N , валідаційної суспензії N_v , а також для всіх підрахунків методу розбавлення-нейтралізації.

Якщо для визначення V_c використовували більше 1 чашки на $1,0 \text{ см}^3$ проби, то підрахунок потрібно записувати для 1 чашки (для кожної чашки окремо).

Якщо кількість КУО на одній чашці більше 330, то результат записують як ">330". Якщо, принаймні, на одній з чашок на пробу $1,0 \text{ см}^3$ результат більш, ніж 330, то значення цього V_c записують як "> сума результатів", наприклад, для "> 330, 310, 302" записують "> 942".

Якщо значення V_c менше 14, то записують це число (але заміняють на "< 14" для подальших підрахунків N_a).

Для методу мембранної фільтрації значенням V_c є кількість КУО на фільтрі. Записувати значення V_c менше 14 та більше 165, як описано вище.

Для подальшого підрахунку в увагу приймати тільки ті значення V_c , що попадають у відповідні границі обліку, крім варіанта N_a (згідно з підпунктом 8.1.).

Підрахунок N та N_0

N - це кількість клітин в $1,0 \text{ см}^3$ тест-суспензії у досліді (згідно з підпунктом 3.6.).

Оскільки оцінюються два розведення тест-суспензії, то кількість КУО/ см^3 рахувати як значиме середнє число за формулою 1:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-6}}, \text{ де:}$$

c – сума значень Vc , які беруться до уваги;

n_1 – кількість значень Vc , які беруться до уваги, у першому розбавленні, тобто (10^{-6});

n_2 – кількість значень Vc , які беруться до уваги, у другому розбавленні, тобто (10^{-7});

10^{-6} – фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню.

Округлити підраховані результати до двох значимих цифр: якщо остання цифра менше 5, то попередня цифра не міняється; якщо остання цифра більше 5, то попередня цифра збільшується на одну одиницю; якщо остання цифра дорівнює 5, то округляється попередня цифра до наступної найближчої цифри. Продовжувати цим способом до одержання двох значимих цифр. Результат число КУО/см³ виражається числом між 1,0 і 9,9, помноженим на відповідний ступінь 10.

Приклад:
$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-6}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-6}} = 1,9363 \times 10^8 = 1,9 \times 10^8 \text{ (КУО/см}^3\text{)}$$

N_0 – це кількість КУО/см³ у дослідній суміші на початку експозиції, яка складає 1/10 підрахованого середнього значення N внаслідок десятикратного розбавлення при додаванні засобу та інтерферуючої речовини.

Підрахунок N_a

N_a – це кількість тест-мікроорганізмів, які вижили, в 1,0 см³ дослідної суміші в кінці експозиції. Це значення в 10 раз більше значення Vc внаслідок додавання нейтралізатора і води або 0,1 см³ проби в методі мембранної фільтрації.

Підрахувати середнє значення для кожного послідовного розбавлення Na^0 , Na^{-1} та для засобів для миття рук Na^{-2} , за формулою 2:

$$Na^0, Na^{-1}, Na^{-2} = \frac{c \cdot 10}{n}, \text{ де}$$

c – сума значень Vc , які беруться до уваги;

n – кількість значень Vc , які беруться до уваги.

Якщо один або обидва з повторів значень Vc менше 14 або більше 330 (165) результат виражають як «менш ніж» або «більше ніж».

Приклади:

значення повторів Vc Na^{-1} : 2, 16

$$Na^{-1} = \frac{(<14 + 16) \times 10}{2} = <150 \times 10^1 = <1500 = <1,5 \times 10^3$$

значення повторів Vc Na^{-2} (мембранна фільтрація): >165, >165

$$Na^{-2} = \frac{(>165 + >165) \times 10}{2} = >1650 \times 10^2 = >165.000 = 1,65 \times 10^5$$

значення повторів $V_c Na^0$ (дві чашки на $1,0 \text{ см}^3$ проби): $> 660, 600$

$$Na^0 = \frac{(> 660 + 600) \times 10}{2} = > 6300 \times 10^0 = > 6300 = > 6,3 \times 10^3$$

Для підрахунку Na використовують тільки ті результати Na^0, Na^{-1}, Na^{-2} , де одне або обидва значення V_c знаходяться в межах обліку.

Хоча розбавлення 10^{-2} готується лише при дослідженні засобів для миття рук, приведені нижче приклади включають це розбавлення.

Виключення і правила для спеціальних випадків.

Якщо всі послідовні розбавлення Na демонструють середні значення «більше ніж», то беруть тільки найбільше розбавлення (10^{-1} , а для засобів для миття рук 10^{-2}) як результат Na .

Приклад:	V_{c1}	V_{c2}	середнє $\cdot 10$	
Na^0	$> 660,$	$> 660,$	$= > 6600$	
Na^{-1}	$> 660,$	$> 660,$	$= > 6600$	
Na^{-2}	$> 660,$	$> 660,$	$= > 6600$	$Na = > 6600 \cdot 10^2 = > 6,6 \cdot 10^5$

Якщо всі послідовні розбавлення Na демонструють середні значення «менш ніж», то беруть тільки найменше розбавлення (10^0) як результат Na .

Приклад:

	V_{c1}	V_{c2}	середнє $\cdot 10$	
Na^0	$< 14,$	18	$= < 160$	
Na^{-1}	$< 14,$	< 14	$= < 140$	
Na^{-2}	$< 14,$	< 14	$= < 140$	$Na = < 160 \cdot 10^0 = < 1,6 \cdot 10^2$

Якщо одне або обидва значення повторів V_c тільки в одному розбавленні Na знаходяться в межах обліку, то використовують цей результат як Na .

Приклад:

	V_{c1}	V_{c2}	середнє $\cdot 10$	
Na^0	$> 660,$	> 660	$= > 6600$	
Na^{-1}	96,	107	$= 1015$	$Na = 1015 \cdot 10^1 = 1,0 \cdot 10^4$
Na^{-2}	$< 14,$	< 14	$= < 140$	

Якщо найбільше розбавлення в двох послідовних розбавленнях Na демонструє середні значення «менш ніж», а найменше розбавлення демонструє середні значення «більше ніж», то для обрахунку значення Na береться тільки найменше розбавлення.

Приклад:

	V_{c1}	V_{c2}	середнє $\cdot 10$	
Na^0	$> 660,$	> 660	$= > 6600$	
Na^{-1}	$< 14,$	29	$= < 215$	$Na = > 6600 \cdot 10^0 = > 6,6 \cdot 10^3$
Na^{-2}	< 14	< 14	$= < 140$	

Для підрахунку значимого середнього значення N_a треба використовувати максимум 2 послідовних розбавлення.

Виключення і правила для спеціальних випадків.

Якщо одне або обидва значення повторів V_c в 3-х або більше послідовних розбавленнях N_a (включаючи N_a^0) знаходяться в межах обліку (наприклад, N_a^0 : 308, > 330; N_a^{-1} : 120, 135; N_a^{-2} : 17, 23), то весь дослід являється недійсним.

Якщо два послідовних розбавлення N_a показують повтор значень V_c в межах обліку, то для підрахунку значимого середнього значення N_a використовується формула 3:

$$N_a = \frac{c \cdot 10}{2,2 \cdot 10^z}, \text{ де}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

z – фактор розбавлення, який відповідає меншому розбавленню, наприклад N_a^0 – це менше розбавлення порівняно з N_a^{-1} .

Якщо в двох послідовних розбавленнях N_a обидва значення V_c більшого розбавлення знаходяться в межах обліку і одне значення V_c меншого розбавлення є «більше ніж», то для підрахунку значимого середнього значення N_a використовується формула 3.

Приклад:

	V_{c1}	V_{c2}	середнє · 10	
N_a^0	> 538,	320	> 4290	$N_a = \frac{(>538 + 320 + 46 + 57) \times 10}{2,2 \times 10^0} =$ $> 4368,18 = > 4,4 \cdot 10^3$
N_a^{-1}	46,	57	515	
N_a^{-2}	< 14,	< 14	< 140	

Якщо в двох послідовних розбавленнях N_a один з повторів більшого розбавлення демонструє «<14», то за результат N_a беруть тільки менше розбавлення.

Приклад:

	V_{c1}	V_{c2}	середнє · 10	
N_a^0	> 660,	> 660	= > 6600	$N_a = > 6145 \cdot 10^1 = > 6,1 \cdot 10^4$
N_a^{-1}	569,	> 660	= > 6145	
N_a^{-2}	< 14,	26	= < 200	

Підрахунок N_v , N_{v0}

N_v – це кількість КУО в $1,0 \text{ см}^3$ валідаційної суспензії (згідно з підпунктом 3.6.), яка в 10 разів більше, ніж значення V_c внаслідок розбавлення 10^{-1} (згідно з підпунктом 3.6.).

N_{v0} – це кількість КУО/см³ у сумішах А, В та С на початку експозиції.
 N_{v0} – це 1/10 середнього числа V_c значень N_v , які беруться до уваги.

Підрахуйте N_v , N_{v_0} за формулами 4 та 5:

$$N_v = \frac{c \times 10}{n}$$

$$N_{v_0} = \frac{c}{n}, \text{ де}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги.

Підрахунок A , B , C

A , B та C – це кількість тест-мікроорганізмів, які вижили, в контролі експериментальних умов A , контролі відсутності токсичності нейтралізатора B або контролі фільтрації і валідації методу C в кінці експозиції t (A) або визначених 5 хв (B) і 30 хв (C). Вони відповідають середньому значенню V_c сумішей A , B і C , які беруться до уваги.

Підрахувати A , B та C за формулою 6.

$$A, B, C = \frac{c}{n}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

- всі результати відповідають критеріям підпункту 8.1.);
- всі вимоги підпункту 10.3 виконано;
- він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Для результатів, підрахованих шляхом визначення значимих середніх значень двох послідовних розбавлень (наприклад, N), відношення середнього значення цих двох результатів має бути не більше 15 і не менше 5. Результати нижче меншої границі приймаються як число меншої границі (14). Результати вище відповідно більшої границі (згідно з підпунктом 8.1.) приймаються як число більшої границі (330 або 165 у випадку методу мембранної фільтрації).

Приклад:

Для N : розбавлення 10^{-6} : $168 + 215$ КУО/см³; 10^{-7} : $20 + <14$ КУО/см³;
 $(168+215)/(20+14) = 383/34 = 11,26 = \text{між } 5 \text{ і } 15$.

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

N	було між $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см ³ і $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см ³	$(8,17 \leq \lg N \leq 8,70)$
N (модифікований метод)	було між $1,5 \cdot 10^9$ КУО/см ³ і $5,0 \cdot 10^9$ КУО/см ³	$(9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$

N_0	було між $1,5 \cdot 10^7$ КУО/см ³ і $5,0 \cdot 10^7$ КУО/см ³	$(7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70)$
N_{V_0}	було між 30 і 160 КУО/см ³	$(3,0 \cdot 10^1 \text{ і } 1,6 \cdot 10^2)$
N_V	було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см ³	
N_V (модифікований метод)	було між $3,0 \cdot 10^3$ і $1,6 \cdot 10^4$ КУО/см ³	
A, B, C	дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{V_0}$	

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

У випадку застосування модифікованого методу для готових до використання засобів границі для N та N_V в 10 раз вище, а для N_0 та N_{V_0} – незмінні.

8.2. Облік мікобактерицидної (туберкулоцидної) активності дезінфекційних засобів у суспензійному методі

Інкубувати чашки з СМК при $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ протягом 21 доби. Далі згідно з підпунктом 8.1.

Визначення значень V_c (експериментальні дані)
Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Підрахунок N та N_0
Проводити згідно з підпунктом 8.1. за винятком:
фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню – 10^{-7}

Приклад:
$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-7}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-7}} = 1,9363 \times 10^9 = 1,9 \times 10^9 \text{ (КУО/см}^3\text{)}$$

Підрахунки N_a , N_V , N_{V_0} , A, B, C
Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу
Дослід вважати дійсним якщо:

- всі результати відповідають критеріям підпункту 8.2.);
- всі вимоги підпункту 10.3 виконано;
- він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень
Проводити згідно з підпунктом 8.1.).
Основні границі

Проводити згідно з підпунктом 8.1. за винятком:

$$\begin{aligned} N & \text{ було між } 1,5 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3 \text{ і } 5,0 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3 & (9,17 \leq \lg N \leq 9,70) \\ N_0 & \text{ було між } 1,5 \cdot 10^8 \text{ КУО/см}^3 \text{ і } 5,0 \cdot 10^8 \text{ КУО/см}^3 & (8,17 \leq \lg N_0 \leq 8,70) \end{aligned}$$

8.3. Облік фунгіцидної активності дезінфекційних засобів у суспензійному методі

Інкубувати чашки з СА чи Сабуро агаром при $(30,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ протягом 48 год (*S. albicans*) або від 42 год до 48 год (*A. niger*). Відкинути ті чашки, на яких неможливо зробити облік (з будь-якої причини). Підрахувати чашки і визначити кількість КУО для кожної чашки. Інкубувати чашки з *A. niger* ще від 20 год до 24 год. Далі згідно з підпунктом 8.1.

Визначення значень V_c

Звичайні межі для підрахунку дріжджів на чашках з агаром – 15 - 300 колоній, плісняви – 15 - 150 колоній. Припустимим вважається відхилення 10,0 %, тому межа складає 14 і 330 для дріжджів та 14 і 165 для плісняви. Для обліку на мембранних фільтрах зазвичай верхня межа інша: 150 для дріжджів та 50 для плісняви, а з урахуванням 10,0 % відхилення – 165 та 55 відповідно.

Якщо кількість КУО на одній чашці більше 165 (або 330), то результат записати як "> 165" (або "> 330"). Якщо, принаймні, на одній з чашок на пробу $1,0 \text{ см}^3$ результат більш, ніж 330 (165), то значення цього V_c записати як "> сума результатів", наприклад, для "> 165, 132, 144" записують "> 441".

Якщо значення V_c менше 14, то записати це число (але заміняють на "< 14" для подальших підрахунків N_a).

Для методу мембранної фільтрації кількість КУО на фільтрі є значенням V_c . Записати значення V_c менше 14 та більше 165 (55) як описано вище.

Для подальшого підрахунку в увагу приймати тільки ті значення V_c , що попадають у відповідні границі обліку, крім варіанта N_a (згідно з підпунктом 8.1.).

Підрахунок N та N_0

Проводити згідно з підпунктом 8.1. за винятком:

фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню – 10^{-5}

Приклад:

$$N = \frac{139+154+14+17}{(2+0,1 \times 2)10^{-5}} = \frac{324}{2,2 \times 10^{-5}} = 1,4727 \times 10^7 = 1,5 \times 10^7 \text{ (КУО/см}^3\text{)}$$

Підрахунок N_a

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Приклади:

Значення повторів V_c : 2, 16

$$Na = \frac{(<14 + 16) \times 10}{2} = <150$$

Значення повторів Vc Na (метод глибинного посіву, *A. niger*): > 165, > 165

$$Na = \frac{(>165 + >165) \times 10}{2} = >1650$$

Значення повторів Vc (мембранна фільтрація, *A. niger*): > 55, 40

$$Na = \frac{(40 + >55) \times 10}{2} = >475$$

Значення повторів Vc (*C. albicans*): >660, 600

$$Na = \frac{(>660 + 600) \times 10}{2} = >6300$$

Підрахунок N_v , N_{v0} , A, B, C

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

- всі результати відповідають критеріям підпункту 8.3.);
- всі вимоги підпункту 10.3 виконано;
- він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Приклад:

Для N: розбавлення 10^{-5} : >165 + 150 КУО/см³, 10^{-6} : 20 + 25 КУО/см³;
 $(165+150)/(20+25) = 315/45 = 7,0 =$ між 5 і 15.

Основні границі

Проводити згідно з підпунктом 8.1. за винятком:

N було між $1,5 \cdot 10^7$ КУО/см³ і $5,0 \cdot 10^7$ КУО/см³ ($7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$)
 N_0 було між $1,5 \cdot 10^6$ КУО/см³ і $5,0 \cdot 10^6$ КУО/см³ ($6,17 \leq \lg N_0 \leq 6,70$)

8.4. Облік спороцидної активності дезінфекційних засобів у суспензійному методі

Інкубувати всі посіви мінімум 4 доби, максимум – 7 діб при $(36,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ або $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$. Відкинути ті чашки, на яких неможливо зробити облік (з будь-якої причини). Підрахувати чашки і визначити кількість КУО для кожної чашки. Контроль росту проводити кожен день. Не враховувати чашки, на яких не видно окремих колоній. Знову врахувати чашки, що залишилися. Якщо

кількість КУО збільшилася, то для подальшої оцінки використовувати тільки їх більшу кількість.

Далі згідно з підпунктом 8.1.

Обчислення А, В та С

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям підпункту 8.1.) та 8.4.;

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевіряють, щоб:

N було між $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³ і $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³ і $(8,17 \leq \lg N_1 \leq 8,70)$

N₀ було між $1,5 \cdot 10^7$ КУО/см³ і $5,0 \cdot 10^7$ КУО/см³ і $(7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70)$

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

A, B, C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{v0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

8.5. Облік бактерицидної активності деззасобів при знезараженні медичного інструментарію методом занурення

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Першим кроком в обчисленні є визначення значень V_c, другим – N, N_a, N_w, N_{v0}, N_v, A, B і C. Третій крок - це обчислення редукції R (згідно з підпунктом 10.1).

Визначення значень V_c (експериментальні дані)

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Підрахунок N та N_w

Для підрахунку N – див. підпункт 8.1. за винятком (згідно формули 7):

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-7}}, \text{ де:}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n_1 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у першому розбавленні, тобто (10^{-7});

n_2 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у другому розбавленні, тобто (10^{-8});

10^{-7} – фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню.

Приклад:
$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-7}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-7}} = 1,9363 \times 10^9 = 1,9 \times 10^9 \text{ (КУО/см}^3\text{)}$$

N_w – це кількість КУО/см³ у тест-суміші в кінці експозиції та перед нейтралізацією, яка в 10 раз більше, ніж значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора. Підрахувати кількість КУО/см³ як середнє значення розбавлення 10^{-5} , використовуючи формулу 8:

$$N_w = \frac{c \times 10}{(n)10^{-5}}, \text{ де}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги.

Підрахунки N_a , N_v , N_{v0} , A , B , C

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Тест вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям 8.5.;

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1. (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Приклад:

Для N : розбавлення 10^{-7} : $168 + 215$ КУО, розбавлення 10^{-8} : $20 + < 14$ КУО;
 $(168+215)/(20+14) = 383/34 = 11,26 = \text{між } 5 \text{ та } 15$.

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

$$N \quad \text{було між } 1,5 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3 \text{ і } 5,0 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3 \quad (9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$$

$$N_w \quad \text{було не менше } 1,4 \cdot 10^7 \text{ КУО/см}^3 \text{ і не більше } 0,05 \cdot N \quad (7,15 \leq \lg N_w \leq \lg N - 1,3)$$

при визначенні границь N_w береться до уваги розбавлення при додаванні нейтралізатора; найнижча границя (7,15) – це мінімальне значення N_w , при якому можна підрахувати редукцію, яка вимагається (згідно розділу 2); верхня границя відбиває розбавлення N перед висушуванням на носії.

$$N_{v0} \quad \text{було між } 30 \text{ і } 160 \text{ КУО/см}^3 \quad (3,0 \cdot 10^1 \text{ і } 1,6 \cdot 10^2)$$

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

A, B, C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{v0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

8.6. Облік мікобактерицидної (туберкулоцидної) активності деззасобів при знезараженні медичного інструментарію методом занурення

Облік результатів та підрахунки

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Визначення значень V_c (експериментальні дані)

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Підрахунок N та N_w

Для підрахунку N – див. підпункт 8.1.

N_w – це кількість КУО/см³ у дослідній суміші в кінці експозиції та перед нейтралізацією, яка в 10 раз більше, ніж значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора. Підрахувати кількість КУО/см³ як середнє значення розбавлення 10^{-4} та 10^{-5} , використовуючи формулу 9:

$$N_w = \frac{C}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-4}}, \text{ де}$$

C – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n_1 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у першому розбавленні, тобто (10^{-4});

n_2 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у другому розбавленні, тобто (10^{-5}).

Підрахунки N_a , N_v , N_{v0} , A , B , C

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям підпункту 8.6.;

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

N було між $1,5 \cdot 10^9$ КУО/см³ і $(9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$

$5,0 \cdot 10^9$ КУО/см³

N_w було не менше $1,4 \cdot 10^6$ КУО/см³ і не $(6,15 \leq \lg N_0 \leq \lg N - 1,3)$ більше $0,05 \cdot N$

при визначенні границь N_w береться до уваги розбавлення при додаванні

нейтралізатора; найнижча границя (6,15) – це мінімальне значення N_w , при якому можна підрахувати редуцію, яка вимагається (згідно розділу 2); верхня границя відбиває розбавлення N перед висушуванням на носії.

N_{v_0} було між 30 і 160 КУО/см³ ($3,0 \cdot 10^1$ і $1,6 \cdot 10^2$)

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

A, B, C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{v_0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

8.7. Облік фунгіцидної активності деззасобів при знезараженні медичного інструментарію методом занурення

Проводити згідно з підпунктом 8.3.

Визначення значень V_c

Проводити згідно з підпунктом 8.3.

Підрахунок N та N_w

Для підрахунку N – див. підпункт 8.1. за винятком:

фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню – 10^{-6}

Приклад: $N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-6}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-6}} = 1,9363 \times 10^8 = 1,9 \times 10^8$ (КУО/см³)

N_w – це кількість КУО/см³ у дослідній суміші в кінці експозиції та перед нейтралізацією, яка в 10 раз більше, ніж значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора. Підрахувати кількість КУО/см³ як середнє значення розбавлення 10^{-4} , використовуючи формулу 10:

$$N_w = \frac{C}{n \times 10^{-4}}, \text{ де}$$

C – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги.

Підрахунок N_a

Підрахунок і приклади див. підпункт 8.1.

Підрахунок N_v , N_{v_0} , A, B, C

Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям підпункту 8.7.);

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

N було між $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³ і $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см³ $(8,17 \leq \lg N \leq 8,70)$

N_w було не менше $1,4 \cdot 10^6$ КУО/см³ і не більше $0,05 \cdot N$ $(6,15 \leq \lg N_w \leq \lg N - 1,3)$

при визначенні границь N_w береться до уваги розбавлення при додаванні нейтралізатора; найнижча границя (6,15) – це мінімальне значення N_w , при якому можна підрахувати редукцію, яка вимагається (згідно розділу 2); верхня границя відбиває розбавлення N перед висушуванням на носії.

N_{V_0} було між 30 і 160 КУО/см³ $(3,0 \cdot 10^1$ і $1,6 \cdot 10^2)$

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

A, B, C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{V_0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

8.8. Облік результатів, отриманих при знезараженні гумових шлангів

Посіви інкубувати 7 днів (21 день - мікобактерії) при температурі $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, гриби – при $(30,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

Першим кроком є визначення N_a - наявність чи відсутність росту в пробірках з відповідними поживними середовищами (ТСБ – для бактерій, МАДС – для мікобактерій, СБ чи Сабуро бульйон – для грибів), другим – кількісний облік N та якісний облік N_w і C .

Визначення наявності чи відсутності росту в пробірках N_a , N_w , C

Уважно проглянути пробірки з посівами на наявність росту (помутніння середовища). З усіх пробірок (з помутнінням та без) зробити пересів петлею на відповідні щільні поживні середовища (ТСА, СМК, СА або Сабуро агар) – якісний облік. Результати записати наступним чином:

- відсутність росту
- + ріст окремих колоній
- ++ сильний ріст (більше 10 колоній)

Підрахунок N

Для підрахунку N див. 8.5. (для бактерій), 8.6. (для мікобактерій) та 8.7. (для грибів).

Основні межі:

	Бактерії	Мікобактерії	Гриби
N	$1,5 \cdot 10^9$ КУО/см ³ - $5,0 \cdot 10^9$ КУО/см ³ $(9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$	$1,5 \cdot 10^9$ КУО/см ³ - $5,0 \cdot 10^9$ КУО/см ³ $(9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$	$1,5 \cdot 10^8$ КУО/см ³ - $5,0 \cdot 10^8$ КУО/см ³ $(8,17 \leq \lg N \leq 8,70)$
N_w	Наявність росту		
C	Наявність росту		

8.9. Облік результатів, отриманих при знезараженні білизни (хімічний та термохімічний методи)

Умови інкубації див. 8.1, 8.2, 8.3.

Першим кроком в обчисленні є визначення значень V_c , другим – N , N_p , N_a , N_w , N_{v0} , N_v і C . Третій крок - це обчислення редукції R (згідно з підпунктом 10.2).

Визначення значень V_c

Проводити згідно з підпунктами 8.1., 8.2. та 8.3.

Для подальшого підрахунку до уваги прийняти тільки ті значення V_c , що попадають у відповідні границі обліку, крім варіанта N_a у термохімічному методі, коли для подальших розрахунків можуть використовуватися результати посіву $1,0 \text{ см}^3$ нерозбавленої проби, навіть якщо було менше 14 КУО/см^3 . Це необхідно, для того, щоб було можливо провести підрахунок необхідного рівня редукції – $7 \lg$ для бактерій та $6 \lg$ для грибів.

Підрахунок N , N_p та N_w

Для підрахунку N див. підпункт 8.5. (для бактерій), підпункт 8.2. (для мікобактерій) та підпункт 8.7. (для грибів).

Для підрахунку N_p див. підпункт 8.1. (для бактерій і мікобактерій) та підпункт 8.3. (для грибів).

N_w – це кількість КУО/см^3 у контрольній тест суміші в кінці експозиції, яка в 5 раз більше, ніж значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора. Підрахувати кількість КУО/см^3 як середнє значення розбавлення 10^{-z} , використовуючи формулу 11:

$$N_w = \frac{c \times 5}{(n)10^z}, \text{ де}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги;

z – показник розбавлення, при якому кількість КУО у пробі є у значимих межах (наприклад, для бактерій 10^{-5} , для грибів 10^{-4}).

Підрахунок N_a

N_a – це кількість тест-мікроорганізмів в досліді, які вижили, в $1,0 \text{ см}^3$ дослідної суміші в кінці експозиції, яка в 5 раз більше значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора.

Підрахувати середнє значення для кожного послідовного розбавлення N_a^0 , N_a^{-1} та C за формулою 12:

$$N_a^0, N_a^{-1} = \frac{c \cdot 5}{n}, \text{ де}$$

c – сума значень V_c , які беруться до уваги;

n – кількість значень V_c , які беруться до уваги.

Перевірка методу

Тест вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям підпункту 8.9.);

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1.) (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

N було між $1,5 \cdot 10^9 - 5 \cdot 10^9$ КУО/см³ ($9,17 \leq \lg N \leq 9,70$)
(для *C. albicans* $1,5 \cdot 10^8 - 5 \cdot 10^8$ КУО/см³) ($8,17 \leq \lg N \leq 8,70$)

N_n $N_w \leq N_n \leq N$

N_w було не менше $1,0 \cdot 10^8$ КУО/см³ ($8,0 \leq \lg N_w$)

(для *C. albicans* $1,0 \cdot 10^7$ КУО/см³) ($7,0 \leq \lg N_w$)

при визначенні границь N_w береться до уваги розбавлення при додаванні нейтралізатора; найнижча границя (8,0 та 7,0) – це мінімальне значення N_w , при якому можна підрахувати редукцію, яка вимагається (згідно розділу 2);

N_{v0} було між 30 і 160 КУО/см³ ($3,0 \cdot 10^1$ і $1,6 \cdot 10^2$)

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{v0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.):
коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

8.10. Облік активності дезінфекційних засобів у методі знезараження поверхонь

Проводити згідно з підпунктами 8.1, 8.2, 8.3.

Першим кроком в обчисленні є визначення значень V_c , другим – N , N_a , N_w , N_{v0} , N_v , B і C . Третій крок - це обчислення редукції R (згідно з підпунктом 10.1).

Визначення значень V_c

Проводити згідно з підпунктами 8.1, 8.2., 8.3.

Підрахунок N та N_w

Для підрахунку N – див. підпункти 8.5., 8.6., 8.7.

N_w – це кількість КУО/см³ у дослідній суміші в кінці експозиції, яка в 10 раз більше, ніж значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора. Підрахувати кількість КУО/см³ як середнє значення, використовуючи формулу 13:

$$N_w = \frac{c \times 10}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-3(2)}} , \text{ де}$$

- с – сума значень V_c , які беруться до уваги;
 n_1 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у першому розбавленні, тобто 10^{-3} (10^{-2} для грибів);
 n_2 – кількість значень V_c , які беруться до уваги, у другому розбавленні, тобто 10^{-4} (10^{-3} для грибів);
 $10^{-3(2)}$ – фактор розбавлення, який відповідає найменшому розбавленню.

Підрахунок N_a

N_a – це кількість тест-мікроорганізмів, які вижили, в $1,0 \text{ см}^3$ тестової суміші в кінці експозиції, яка в 10 раз більше значення V_c внаслідок додавання нейтралізатора.

Підраховувати середнє значення для кожного послідовного розбавлення N_a за формулою 2.

Підрахунки N_v , N_{v0} , B , C . Проводити згідно з підпунктом 8.1.

Перевірка методу

Дослід вважати дійсним якщо:

всі результати відповідають критеріям підпункту 8.10.;

всі вимоги підпункту 10.3 виконано;

він не є недійсним із-за результату в підпункті 8.1. (в частині “Виключення і правила для спеціальних випадків”).

Контроль значимих середніх значень

Проводити згідно з підпунктом 8.1.).

Основні границі

Для кожного тест-мікроорганізму перевірити, щоб:

N	було між $1,5 \cdot 10^9 - 5 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$ (для <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> $1,5 \cdot 10^8 - 5,0 \cdot 10^8 \text{ КУО/см}^3$)	$(9,17 \leq \lg N \leq 9,70)$ $(8,17 \leq \lg N \leq 8,70)$
N_w	Було не менше $1,4 \cdot 10^7 \text{ КУО/см}^3$ і не більше $0,05 \cdot N$ (для <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> $1,4 \cdot 10^6 \text{ КУО/см}^3$)	$(7,15 \leq \lg N_0 \leq \lg N - 1,3)$ $(6,15 \leq \lg N_0 \leq \lg N - 1,3)$

при визначенні границь N_w береться до уваги розбавлення при додаванні нейтралізатора; найнижча границя (7,15 та 6,15) – це мінімальне значення N_w , при якому можна підрахувати редукцію, яка вимагається (згідно розділу 2); верхня границя відбиває розбавлення N перед висушуванням на носії

N_{v0} було між 30 і 160 КУО/см³ ($3,0 \cdot 10^1$ і $1,6 \cdot 10^2$)

N_v було між $3,0 \cdot 10^2$ і $1,6 \cdot 10^3$ КУО/см³

B, C дорівнювало або було більше ніж $0,5 \cdot N_{v0}$

Контроль значимих середніх значень (згідно з підпунктом 8.1.): коефіцієнт не менше 5 і не більше 15.

9. Визначення ефективності дії антимікробних засобів для гігієни рук (гігієнічна і хірургічна обробка рук)

Гігієна рук складається з гігієнічної та хірургічної обробки рук.

Гігієнічна обробка рук – це процедура обробки рук антимікробним (антисептичним) засобом, яка спрямована проти транзитornoї мікрофлори. Вона виконується двома методами: методом втирання спиртового антисептика в руки без застосування води (гігієнічна антисептика) і методом миття рук антимікробним засобом із застосуванням води (гігієнічне миття). Хірургічна обробка рук – це такі самі процедури, але спрямовані як проти транзитornoї, так і резидентної мікрофлори рук без застосування та із застосуванням води (рис. 1).

Визначення антимікробної активності всіх антисептичних засобів базується на їх поетапному вивченні.

Перші два етапи виконуються для попереднього вивчення засобу, який планується застосовувати в антисептиці. Третій етап – для остаточної оцінки засобу в разі його відповідності вимогам двох попередніх етапів. Крім того, третій етап проводиться для контролю засобу перед його реєстрацією (перереєстрацією) та при поточному контролі в разі необхідності.

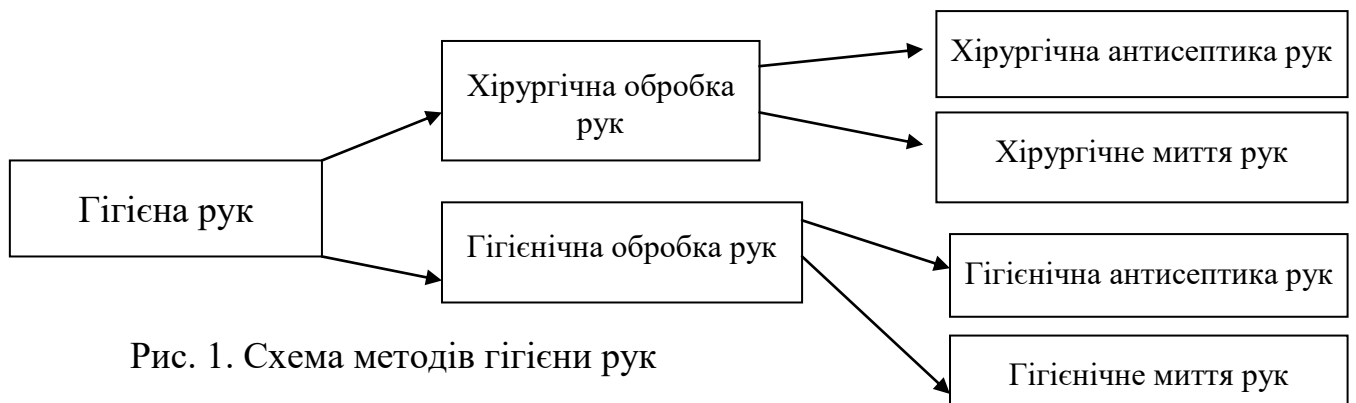


Рис. 1. Схема методів гігієни рук

Першим етапом передбачено виявлення принципіальної здатності даного препарату спричиняти бактерицидну та фунгіцидну дію на мікроорганізми. З цією метою використовується суспензійний метод, принцип якого полягає у визначенні кількості мікроорганізмів, що вижили, в розчині антисептичного засобу з певною концентрацією без органічного навантаження за вибраний час експозиції. Після закінчення експозиції вираховується $\lg$ ступеня редукції:

різниця між кількістю мікроорганізмів, що вижили, у досліді та в контролі, яка характеризує антимікробну активність засобу, який вивчається. На цьому етапі для визначення бактерицидної дії використовується *S. aureus* і *P.aeruginosa*, для визначення фунгіцидної активності – *C. albicans* та *A. niger*. При цьому вимагається зниження кількості бактерій на 5 lg, а грибів – на 4 lg. У випадку отримання вказаних результатів робиться заключення про доцільність подальшого вивчення антимікробної активності препарату з метою його застосування в антисептиці, і розпочинають другий етап досліджень.

Другий етап проводиться зі всіма засобами, що продемонстрували необхідну ефективність на першому етапі та планують використовувати для гігієнічної і хірургічної антисептичної обробки та миття рук. Вивчення здійснюється також суспензійним методом (згідно з підпунктом 4) з використанням більш широкого набору тест-штамів мікроорганізмів, а саме:

- 1) засоби для гігієнічного миття рук – в брудних умовах на штаммах *E. coli*, *P.aeruginosa*, *E. hirae* і *S. aureus*; вимагається рівень редукції 3 lg;
- 2) засоби для гігієнічної антисептики рук – в чистих умовах на штаммах *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *S. aureus* та *C. albicans*; вимагається рівень редукції для бактерій - 5 lg, для грибів - 4 lg;
- 3) засоби для хірургічного миття рук – в брудних умовах на штаммах *E. coli*, *P.aeruginosa*, *E. hirae*, *S. aureus*; вимагається рівень редукції - 3 lg.
- 4) засоби для хірургічної антисептики рук – в чистих умовах на штаммах *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. hirae*, *S. aureus* та *C. albicans*; вимагається рівень редукції для бактерій - 5 lg, для грибів - 4 lg.

В разі відповідності засобу вимогам двох попередніх етапів, виконується, як було вказано вище, третій остаточний етап – вивчення ефективності засобу в умовах моделювання практичного застосування.

Методика перевірки якості калієвого мила проводити згідно додатку 29, стандартна процедура обробки рук – додатку 30, приклади наведення результатів та оцінки їх значимості для засобів гігієнічної обробки рук – у додатках 31-32.

10. Інтерпретація результатів

10.1. Суспензійний метод

Для кожного тест-мікроорганізму обраховується кількість КУО/см³ в тест-суспензії N та N_0 та результати дослідів N_a .

Редукція ($R = N_0/N_a$) виражається в логарифмах.

Для кожної концентрації засобу і кожної експериментальної умови окремо підраховується і записується десятковий логарифм редукції за формулами 18, 19:

$$R = \frac{N_0}{N_a}$$

$$\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$$

Для контролів і валідації методів розбавлення-нейтралізації або мембранної фільтрації записують N_{v_0} , результати А, В і С та їх порівняння з N_{v_0}

10.2. Дослідження на носіях

Дезінфекція інструментів (згідно розділу 5) та дезінфекція поверхонь (згідно розділу 7).

При кількісному обліку результатів досліду (згідно з підпунктами 5.1, 5.2, 5.3 та розділу 7) для кожного тест-мікроорганізму обраховується кількість КУО/см³ у контролі води N_w та результати досліду N_a .

Редукція ($R = N_w / N_a$) виражається в логарифмах.

Для кожної концентрації засобу і кожної експериментальної умови окремо підраховується і записується десятковий логарифм редукції за формулами 20, 21:

$$R = \frac{N_w}{N_a}$$

$$\lg R = \lg N_w - \lg N_a$$

Для контролів і валідації в дослідах записують N_{v_0} , результати А (крім розділу 7), В і С та їх порівняння з N_{v_0} .

При якісному обліку результатів (згідно з підпунктом 5.4) відмічається наявність або відсутність росту у пробірках з N_a , контролем води N_w та С. Відповідно до цього, тобто спостерігається ріст у пробірках з N_a або не спостерігається, виводять ефективні або неефективні співвідношення концентрації і часу контакту. При цьому результати можна вважати валідними, якщо спостерігається аналогічний ріст у пробірках з контролем води N_w та С.

Дезінфекція білизни

кількісний облік (проводиться при термохімічній дезінфекції): для кожного тест-мікроорганізму обраховується кількість КУО/см³ у контролі N_w та результати досліду N_a .

Редукція ($R = N_w / N_a$) виражається в логарифмах.

Для кожної концентрації засобу і кожної експериментальної умови окремо підраховується і записується десятковий логарифм редукції за формулами 20, 21.

Для контролів і валідації записують результати N_p та С. При цьому результати можна вважати валідними, якщо валідним є контроль С, а значення N_p та N_w відповідають встановленим межам.

при якісному обліку результатів (проводиться при хімічній дезінфекції) відмічається наявність або відсутність росту у пробірках з N_a та чашках з носіями, контролем води N_w та С. Відповідно до цього, тобто спостерігається ріст у пробірках з N_a або на чашках з носіями або не спостерігається, виводять ефективні або неефективні співвідношення концентрації і часу контакту. При

цьому результати можна вважати валідними, якщо валідним є контроль С, а значення N_p та N_w відповідають встановленим межам.

10.3. Контроль активного і неактивного розчинів засобу (згідно з підпунктом 3.3)

Принаймні одна концентрація в досліді повинна демонструвати редукцію, яка вимагається згідно розділу 2 або більше і, принаймні, одна концентрація повинна демонструвати $\lg$ редукції менше тієї, що вимагається.

10.4. Визначення лімітуючого тест-мікроорганізму і бактерицидної/мікобактерицидної/туберкулоцидної, фунгіцидної, спороцидної концентрації

Для кожного тест-мікроорганізму відмітити найнижчу концентрацію засобу, яка забезпечує необхідну редукцію в досліді ($\lg R$). Як лімітуючий тест-мікроорганізм записати той тест-мікроорганізм, який вимагає найбільшу з цих концентрацій (для кожного виду досліді окремо). Найменша концентрація засобу, яка діє на лімітуючий тест-мікроорганізм, являється бактерицидною (мікобактерицидною/туберкулоцидною), фунгіцидною, спороцидною концентрацією, яка визначена у відповідності з цими Методичними вказівками.

10.5. Точність досліджень, повтори

Беручи до уваги точність методології, визначену статистичним аналізом, на основі даних, отриманих у досліді, мінімальна кількість валідних повторів має бути 3. Повтор означає повну процедуру досліді з окремо приготовленими робочими культурами досліді і валідаційної суспензії. Повтор може обмежуватися лімітуючим тест-мікроорганізмом. Середнє значення результатів повторів – не кожний окремий результат – має демонструвати редукцію, яка вимагається для цього виду досліді (згідно розділу 2).

11. Представлення результатів (звіт)

Звіт повинний містити наступну інформацію:
 ідентифікація лабораторії, яка проводить досліді;
 ідентифікація клієнта;
 опис зразка засобу:

- 1) назва засобу;
- 2) номер серії і, якщо можливо, термін використання;
- 3) виробник, якщо невідомо, то постачальник;
- 4) дата надходження;
- 5) умови зберігання;
- 6) розчинник засобу, який рекомендується для використання виробником;
- 7) активна речовина(и) та її/їх концентрація(ї);
- 8) зовнішній вигляд засобу;

метод та його валідація:

якщо метод розбавлення-нейтралізації або метод на носіях – вибір нейтралізатору: мають бути представлені всі деталі дослідження по валідації нейтралізатору;

якщо метод мембранної фільтрації – мають бути представлені всі деталі проведеної процедури для підтвердження використання цього методу.

умови експерименту:

- 1) дата(и) дослідження (період аналізу);
- 2) розчинник, використаний для розчинів засобу;
- 3) концентрації засобу;
- 4) зовнішній вигляд розбавлень засобу;
- 5) час контакту (експозиція);
- 6) температура(и);
- 7) інтерферуюча речовина(и);
- 8) стабільність та зовнішній вигляд сумішей протягом процедури (інтерферуюча речовина + тест-суспензія, нейтралізована тест-суміш Na); відмітити утворення будь-яких пластівців/осаду;
- 9) температура інкубації;
- 10) нейтралізатор або промивна рідина;
- 11) опис використаних тест-мікроорганізмів;
- 12) час висихання інокульованих носіїв;

результати дослідження:

суспензійний метод та метод занурення:

- 1) контролю;
- 2) оцінка бактерицидної / мікобактерицидної / туберкулоцидної/фунгіцидної / спороцидної активності;
- 3) кількість повторів на кожний тест-мікроорганізм.

ІІІ. ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ЯКОСТІ (ЕФЕКТИВНОСТІ) ЗАСОБІВ ТА ЇХ ВИПРОБУВАННЯ НА ПРАКТИЦІ

1. Досліджень якості проводяться відповідно до:
методики визначення необхідних фізико-хімічних показників дезінфекційного засобу;
методики кількісного визначення діючих(ої) речовин(и) в дезінфекційному засобі.
2. Випробування дезінфекційних засобів на практиці проводяться з метою оцінки шкідливого впливу засобу на здоров'я людини під час його застосування.
3. Випробування на практиці здійснюють відповідно до запропонованих режимів застосування з максимальним навантаженням на об'єкт середовища життєдіяльності людини (експозиція, норма витрати, концентрація діючих речовин), що зазначені в проєкті інструкції щодо використання засобу, поданою заявником.
4. Під час випробування встановлюється можливість дотримання наступних гігієнічних нормативів:
 - 4.1. гігієнічні нормативи в повітря робочої зони та гігієнічні нормативи в атмосферному повітрі населених місць:
для здійснення дезінфекційних заходів в осередках інфекційних хвороб, закладах охорони здоров'я, дошкільних навчальних закладах;
для профілактичної дезінфекції житлових, виробничих, навчальних, санітарно-побутових та інших приміщень, будівель і споруд, транспортних засобів, об'єктів громадського харчування та торгівлі, територій населених пунктів, у місцях масового відпочинку та рекреаційних зонах;
для дезінфекції повітря в приміщеннях;
для знищення переносників збудників інфекційних хвороб (інсектицидні) та для знищення синантропних комах у середовищі життєдіяльності людини, що можуть застосовуватись у присутності людей та побути.
 - 4.2. гігієнічні нормативи в повітря робочої зони:
для "холодної" стерилізації медичних виробів;
для дезінфекції рук медичних працівників; промислової дезінфекції;
для знищення гризунів, які є джерелами та переносниками збудників інфекційних хвороб;
для деконтамінації шкіри рук персоналу підприємств харчової та переробної промисловості, громадського харчування, торгівлі;
для достерилізаційного очищення медичних виробів.
 - 4.3. гігієнічні нормативи в атмосферному повітрі населених місць:
для відлякування комах.
 - 4.4. гігієнічні нормативи в повітря робочої зони та гігієнічні нормативи в воді водойм господарського та побутового призначення:
для дезінфекції води (крім питної), промислових та побутових стоків;
для миття і очищення в промисловості з дезінфекційними властивостями.

IV. ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУЛІЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ

1. Загальні положення

Віруси мають різну стійкість до дії фізичних і хімічних чинників, в тому числі дезінфекційних засобів і субстанцій. Стійкість вірусів до дезінфекційних засобів визначається їх структурою і хімічним складом. Більш стійкі до дії дезінфекційних засобів віруси без ліпідсодержащих оболонки, наприклад, пікорнавіруси, парвовіруси. Віруси з ліпідвмісткою оболонкою, наприклад, віруси грипу, герпесу, ВІЛ відносно легко інактивуються. Механізм дії дезінфекційних засобів на віруси є різним і залежить від хімічного складу. Дезінфекційні засоби можуть вибірково ушкоджувати нуклеїнові кислоти вірусу, білки нуклеокапсида або ліпопротеїни суперкапсидної оболонки. Можливий синхронний вплив на ці структурні елементи, дезінтеграція вірусної частки або блокування рецепторів на її поверхні за рахунок накопичення амфотерних речовин дезінфектанта. Для оцінки віруліцидної активності слід використовувати кілька тест-вірусів з різною стійкістю, що дозволяє оцінити активність дезінфекційних засобів щодо широкого спектра вірусів.

Результати досліджень віруліцидної активності дезінфекційних засобів залежать також від характеру використовуваного вірусовмісткого матеріалу, методу індикації вірусу, методу визначення віруліцидної властивостей дезінфекційних засобів, складу засобів, що випробовуються.

При вивченні віруліцидної активності дезінфекційних засобів необхідно мати його детальну характеристику з зазначенням рецептури, фізико-хімічних властивостей (включаючи розчинність і стабільність), підтверджених результатами вхідного хімічного контролю.

Дезінфекційні засоби, що приймаються для досліджень, повинні відповідати наступним вимогам: мати гарну розчинність в воді, зберігати свою активність у присутності органічних речовин (кров та ін. біологічні субстрати), бути нетоксичними або мало токсичними для людей (і тварин), не мати неприємного запаху, не псувати незаражені предмети.

Неодмінною умовою при дослідженнях віруліцидної активності дезінфекційних засобів є використання нейтралізатора.

Методи вивчення і оцінки віруліцидної активності дезінфекційних засобів гармонізовані з Європейським стандартом 14476. «Хімічні дезінфектанти і антисептики. - віруцидний кількісний суспензійний тест для хімічних дезінфектантів та антисептиків, що використовуються в медицині - Тест-методи і вимоги (фаза 2/ступінь 1) (Включаючи поправки)», 2019 р.

2. Скорочення та аббревіатури

ВС – вірусна суспензія;
 ДЗ – дезінфекційний засіб;
 ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
 ДР – діюча речовина;
 КК – культура клітин;
 МВ – медичні вироби;
 РНК – рибонуклеїнова кислота;
 СВРХ – сироватка великої рогатої худоби;
 ТЦІД₅₀ – 50%-ва тканинна цитопатична інфекційна доза;
 ЦПД – цитопатична дія.

3. Методи вивчення і оцінки віруліцидної активності дезінфекційних засобів

3.1. Тест-віруси, модельні системи, критерії оцінки та основні умови, які необхідно дотримуватися при дослідженні віруліцидної активності ДЗ і їх субстанцій. Застосування нейтралізатора

Тест-віруси. Модельні системи для досліджень ДЗ і субстанцій. При дослідженнях віруліцидної активності ДЗ необхідно використовувати як РНК, так і ДНК-місткі тест-віруси (Додаток 34). При цьому слід враховувати наявність лабораторної моделі, безпеку для осіб, що працюють з вірусом.

Обов'язковим для всіх ДЗ є випробування на двох тест-вірусах: вірус поліомієліту 1 типу (вакцинний штам Sabin (LSc-2ab) (далі – поліовірус) і аденовірус 5 типу (штам аденоїди 75) (далі – аденовірус).

Засіб, який показав здатність інактивувати поліовірус і аденовірус, включають в групу ДЗ з віруліцидною активністю. ДЗ з віруліцидною активністю можуть бути використані для дезінфекції при будь-якій вірусній (включаючи особливо небезпечні) інфекції, що має значення в інфекційній патології людини.

Спектр тест-вірусів може бути розширений, в такому випадку дають додаткову інформацію про результати досліджень на конкретному вірус.

3.2. Модельні системи для досліджень ДЗ і субстанцій. Дослідження *in vitro* в культурі клітин.

В експериментах використовують культури клітин, чутливі до тест-вірусу.

Критерії оцінки віруліцидної активності ДЗ і субстанцій. Віруліцидні ДЗ (субстанції) мають пригнічувати інфекційність обов'язкових для випробувань

тест-вірусів - поліовірусу і аденовірусу на досліджуваних об'єктах не менше, ніж на $4 \log_{10}$ ТЦІД₅₀ (тобто ступінь інактивації повинна бути не менше 99,99%).

Критерієм віруліцидної активності ДЗ (субстанцій) для інших тест-вірусів (включаючи віруси - збудники особливо небезпечних інфекцій) є відсутність інфекційності, яка визначається сучасними методами індикації.

Ступінь інактивації тест-вірусу визначають у чутливих модельних системах з пригнічення цитопатичної активності вірусу в культурі клітин.

Для отримання більш точних результатів тест-вірус слід використовувати з максимальною титром.

Показником віруліцидної активності ДЗ (субстанцій) є швидкість інактивації, яка представляє собою співвідношення концентрації тест-вірусу, виражене в десяткових логарифмах, до і після впливу ДЗ за певний проміжок часу (експозиція). Ступінь зниження вірусної інфекційності обчислюється в десяткових логарифмах за різницею титрів вірусу до і після обробки ДЗ.

Основні умови, які слід дотримуватися при дослідженнях віруліцидної активності ДЗ і субстанцій:

досліджувані ДЗ до, під час і після досліджень (випробувань) повинні зберігатися відповідно до вимог технічних умов (далі - ТУ). При відсутності ТУ необхідно дотримуватися загальних вимог: уникати попадання прямих сонячних променів і вологи, впливу високих температур і заморожування;

при проведенні сертифікаційних випробувань ДЗ зберігають відповідно до правил сертифікації;

розчини ДЗ слід готувати на стерильній водопровідній дехлорованій воді; підтримувати температуру розчинів досліджуваних ДЗ протягом усього експерименту в межах $20^0 \pm 2^0$ С (якщо за умовами експерименту не рекомендована інша температура), незалежно від температури навколишнього середовища;

використовувати робочі розчини ДЗ, вироблених в формі гранул, порошків, таблеток і ін. тільки після повного їх розчинення;

кратність постановки експериментів повинна бути не менше трьох (за умови отримання однакових результатів);

при відсутності цитопатичного ефекту проби піддають необхідній обробці з метою проведення другого, а при необхідності - і третього сліпого пасажу для визначення повноти інгібування тест-вірусу;

експерименти повинні супроводжуватися всіма необхідними контролюми, в тому числі контролем повноти нейтралізації дезінфектанту, життєздатності тест-вірусу, контамінації тест-об'єкта тест-вірусом та культури клітин;

використовувати нейтралізатор, підібраний до конкретного ДЗ;
при дослідженнях ДЗ слід строго дотримуватися рекомендованих заходів індивідуального захисту (рукавички, окуляри, респіратори та ін.).

Застосування нейтралізатора ДЗ і субстанції.

Для нейтралізації ДЗ (субстанції) використовують речовину - нейтралізатор (або комплекс з декількох речовин), що зупиняє дію ДЗ. Нейтралізатор або додають безпосередньо в живильне середовище, або промивають їм тест-об'єкти після впливу ДЗ (субстанції, досліджуваної речовини) для того, щоб зупинити його дію на тест-вірус через заданий час (експозицію).

Для нейтралізації ДЗ у вигляді монопрепарата на основі окислювачів (хлор, йод, кисеньвмісткі засоби) застосовують 0,1-1,0% розчини тіосульфату натрію;

для галоїдактивних (хлор, бром і йодактивні) і кисеньактивних (перекис водню, її комплекси з солями, надцтова кислота, озон) - 0,1-1,0% розчини тіосульфату натрію;

для четвертинних амонієвих солей (алкілдиметилбензиламоній хлорид, дідецілдіметіламоній хлорид і ін.), Похідні гуанідину (полігексаметиленгуанідин гідрохлорид, хлоргексидин біглюконат та ін.) -0,1-1,0% розчини лаурилсульфату натрію (сульфонол) або розчини лаурилсульфату натрію з 10% знежиреного молока або комплексний нейтралізатор (див. нижче);

для альдегідів (глутаровий альдегід, гліоксаль, формальдегід, ортофталевий альдегід) - 1,0% розчин піросульфіту (метабісульфіту) натрію або комплексний нейтралізатор (див. Нижче);

для кислот - луги в еквівалентній кількості;

для лугів - кислоти в еквівалентній кількості;

для спиртів - розведення в воді до недіючої концентрації;

для композиційних засобів - «комплексний» нейтралізатор, наприклад, що містить Твін 80 (3%), сапонін (0,3-3%), гістидин (0,1%), цистеїн (0,1%). Якщо до складу ДЗ входять окислювачі, в нейтралізатор додатково вводять тіосульфат натрію. Слід мати на увазі, що комплексний нейтралізатор має виражену цитотоксичною дією на клітинні культури.

Якщо не вдається підібрати будь-якої з перерахованих нейтралізаторів, що проявляється в неспецифічній дегенерації культури клітин, то використовують 60% - 80% сироватки (без консерванту) великої рогатої худоби (СВРХ), інактивованої при 56°C протягом 30 хвилин. СВЗХ нейтралізує великий перелік ДР і найбільш близька до комплексного нейтралізатору.

При неможливості нейтралізувати токсичну дію ДЗ слід застосовувати додаткові методи видалення ДЗ - діаліз суміші вірус-дезінфектант, наприклад, з використанням сефадексу LH-20, G-75; осадження вірусу методом високошвидкісного центрифугування або фільтрацією через мембранні фільтри.

Отримані результати мають відповідати вимогам, які наведені у додатках 33-37.

3.3. Основні етапи і методи вивчення віруліцидної активності ДЗ і субстанцій.

Дослідження віруліцидної активності ДЗ здійснюється в два етапи:

1) Перший етап досліджень - визначення наявності віруліцидної активності. Проводиться *in vitro* суспензійним методом або методом батистових тест-об'єктів.

2) Другий етап досліджень - вивчення віруліцидної ефективності ДЗ при обробці ними різних тест-об'єктів, повітря, контамінованих тест-вірусом.

В якості тест-об'єктів слід використовувати різні медичні вироби; предмети догляду за хворими та іграшки; білизну, спецодяг та ін. вироби з тканин; посуд, в тому числі лабораторний; різні поверхні в приміщеннях (жорсткі меблі, різні предмети, обладнання, в тому числі санітарно-технічне та ін.); кров; виділення (сеча, фекалії, мокротиння).

Обсяг досліджень і перелік об'єктів знезараження залежить від призначення ДЗ, їх складу, токсикологічної характеристики, форми випуску засобу та ін.

Проводяться також дослідження віруліцидної активності шкірних антисептиків, антимікробних тканин і лакофарбових матеріалів.

Суспензійний метод

До вірусної суспензії (далі - ВС), в якості якої може бути використана культуральна рідина після видалення клітинних залишків, яку додають у випробуваний засіб в обсязі 1: 9 (1 обсяг вірусу і 9 обсягів засобу) в різних концентраціях.

Суспензійний тест проводять в двох варіантах: без білкового навантаження і з білковим навантаженням. В останньому випадку до вірусної суспензії додається інактивована сироватка ВРХ з розрахунку 40% її концентрації в суміші вірус - дезінфектант.

Отриману суміш (як з сироваткою, так і без неї) витримують при кімнатній температурі ($20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) протягом 15-30-60 хвилин, нейтралізують (в співвідношенні 1:1, тобто 1 об'єм суміші і 1 об'єм нейтралізатора), струшуючи

протягом 5-10 хв, і використовують для визначення тест-вірусу в чутливій культурі клітин.

Методика визначення інфекційності вірусу після впливу ДЗ (субстанції): досліджуваний матеріал (суміш вірусу, ДЗ і нейтралізатора) вносять в лунки планшету (пробірки) з вирощеним моношаром клітин або в суспензію клітин (в разі застосування суспензійних культур клітин), через 30-60 хв видаляють суміш, замінюють її культуральним середовищем. Культуру клітин інкубують в термостаті при температурі, необхідній для репродукції вірусу протягом терміну спостереження.

Про віруліцидну активність засобу судять за наявністю або відсутністю цитопатогенної дії, що викликана вірусом.

Всі експерименти супроводжуються контролюми культури клітин, вірусу, повноти нейтралізації.

Ефективним вважають засіб (субстанцію), що забезпечує інактивацію вірусу не більше, ніж за 60 хв.

Метод батистових тест-об'єктів

Дослідження віруліцидної активності ДЗ (субстанцій) цим методом проводять на тест-вірусах, фіксованих на батистових тест-об'єктах. При використанні даного методу відбувається деяка втрата ($1-2 \log$ ТЦІД₅₀/мл) вірусних частинок під час занурення контамінованих тест-об'єктів в розчин ДЗ, нейтралізатор і при подальшому відмиванні від залишків ДЗ. Однак цей метод більш прийнятний для вивчення ДЗ, продукти нейтралізації яких токсичні для культури клітин і викликають в них неспецифічні дегенеративні зміни.

Підготовка експерименту. Вірусною суспензією контамінують батистові тест-об'єкти (далі «тести»). В якості тестів використовують шматочки батисту розміром 1х0,5 см, попередньо випрані (тобто - звільнені від крохмалю) і пропрасовані. Тести поміщають в стерильну чашку Петрі і заливають вірусмісткою рідиною з розрахунку 0,05 - 0,1 мл рідини на один тест (без сироватки або з додаванням 40 відсотків СВРХ). Тести підсушують при кімнатній температурі не менше 60 хв. Контаміновані вірусом тести використовують в дослідках. Тести не слід заготовляти про запас, їх контамінують вірусом *ex tempore*.

При дослідженні віруліцидної активності готують 3 - 5 концентрацій розчину ДЗ на стерильній дехлорованій водопровідній воді з розрахунку 1,0 мл розчину на кожен тест.

Постановка експерименту. У досліджувані розчини занурюють контаміновані вірусом тести по 5 штук на кожен експозицію.

Момент змочування тестів розчином ДЗ є початком досліду і з цього моменту відраховують експозицію. Через 5-15-30-45-60 хвилин стерильним охолодженим пінцетом чи петлею витягають по 5 тестів, поміщають їх в пробірку з намистом (зі скла, пластику) з 5 мл стерильного розчину нейтралізатора, поміщають в шуттель-апарат на 10 хв.

Після закінчення кожної експозиції змивною рідиною заражають культуру клітин. Культуру клітин, відмиту від ростового середовища, залишають на контакт на 30-60 хв. для адсорбції вірусу. Потім клітини промивають розчином Хенкса і заливають підтримуючим середовищем з сироваткою. Клітини інкубують в термостаті при оптимальній для конкретного вірусу температурі.

Критерієм віруліцидної активності ДЗ є зниження кількості вірусу не менше, ніж на $4 \log_{10}$ при експозиції не більше, ніж 60 хв.

Контроль культури клітин. З цією метою залишають незараженими пробірки з культурою клітин і спостерігають протягом максимального терміну досліду. При роботі з культурою клітин в контрольних пробірках також, як і в дослідних, при необхідності змінюють підтримуюче середовище в залежності від зміни рН.

Контроль вірусу. З цією метою 5 штук тестів, контамінованих вірусом, поміщають в пробірку з 5 мл розчину Хенкса, витримують максимальну експозицію, яка використовується в експерименті; переносять в пробірки з 5 мл нейтралізатора і намистом, струшують в шуттель-апараті протягом 10 хв і заражають культуру клітин відповідною дозою (0,2 мл або менше) рідини, відмитой з тестів. Для з'ясування кількості життєздатного вірусу проводять титрування.

Неспецифічний цитопатичний ефект (ЦПЕ) може бути при неповній нейтралізації дезінфектанту або цитотоксичному ефекті суміші «дезінфектант + нейтралізатор». Виключити неспецифічний цитотоксичний ефект в деяких випадках вдається шляхом додаткового відмивання моношару розчином Хенкса після контакту клітин з внесеної пробою з нейтралізатором протягом 60 хв для адсорбції вірусу на поверхні клітин. По закінченню цього часу додають підтримуюче середовище. Уникнути неповної нейтралізації можна шляхом ретельного відпрацювання умов нейтралізації або пошуку іншого нейтралізатора.

Контроль контамінації вірусом тестів. З цією метою 5 штук тестів, контамінованих вірусом, поміщають в пробірку з намистом і з 5 мл фізіологічного розчину, відмивають в шуттель-апараті протягом 10 хвилин і відповідною дозою (0,2 мл або менше, як в досліді) рідини, одержаної після

відмивання тестів, заражують культуру клітин. Для визначення ступеня контамінації тестів вірусом проводять титрування.

Контроль повноти нейтралізації ДЗ. З цією метою 5 штук тестів (без вірусу) поміщають на максимальну експозицію, яка використовується в експерименті, в 5 мл розчину максимальної концентрації ДЗ. Після цього тести переносять на 5 хвилин в 5 мл розчину нейтралізатора, відмивають з намістом протягом 10 хвилин і вносять (по 0,2 мл або менше) змив з тестів в культуру клітин.

Дослідження віруліцидної активності субстанції завершуються першим етапом.

Дослідження віруліцидної активності ДЗ, призначених для дезінфекції при особливо небезпечних вірусних інфекціях завершуються першим етапом, якщо збудник по стійкості до конкретного ДЗ не перевищує поліовірус і аденовірус.

Після отримання даних про наявність у ДЗ віруліцидної активності дослідження тривають на другому етапі - вивчення ефективності при знезараженні різних об'єктів.

Ефективним вважають засіб (субстанцію), що забезпечує інактивацію вірусу за умови експозиції не більше 60 хв.

3.4. Методи вивчення і оцінки віруліцидної ефективності ДЗ, призначених для знезараження різних об'єктів, контамінованих тест-вірусами

Дослідження ефективності ДЗ при знезараженні різних об'єктів (медичні вироби, включаючи ендоскопи, посуд, білизну, поверхні, виділення та ін.), що мають епідеміологічне значення в поширенні інфекційних захворювань вірусної етіології, проводять з метою розробки ефективних режимів дезінфекції. Отримані позитивні результати в дослідях на тест-віруси уточнюють (при необхідності) на віруси - збудники тієї інфекції, при якій вони будуть використані, враховуючи їх специфіку і механізм передачі інфекції. Обсяг досліджень ДЗ залежить від їх передбачуваного призначення і може включати всі або деякі з наведених нижче об'єктів.

Визначення віруліцидної активності ДС, призначених для знезараження медичних виробів

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження МВ (крім ендоскопів) з різних матеріалів

В якості тест-виробів використовують стерильні інструменти та інші МВ (в тому числі одноразового застосування): такі, що мають замкові частини (щипці, ножиці, корнцанги), що не мають, замкових частин (пінцети, шпателі);

стоматологічні, в тому числі обертові, інструменти (бори, бури кореневі, дзеркала, диски шліфувальні) з різних матеріалів (металів, гум, скла, пластмас) або імітують їх тест-об'єкти.

Контамінація виробів тест-вірусом. Простерилізовані або продезінфіковані (способом кип'ятіння) тест-вироби контамінують вірусом з додаванням 40 % інактивованої (без консерванту) СВРХ як органічного навантаження (наприклад, до 6 мл вірусмісткої рідини додають 4 мл нерозведеної сироватки), перемішують. Якщо засіб має фіксуючі властивості, то сироватку в якості білкового навантаження додають в кількості 5%.

Підготованою сумішшю контамінують вироби, повністю занурюючи в неї дрібні, а на великі наносять піпеткою, стежачи за рівномірним зволоженням всієї поверхні. Канали виробів заповнюють за допомогою шприца або іншого пристрою, уникаючи утворення бульбашок повітря.

Роз'ємні вироби занурюють в суміш і, опускаючи в неї, роблять кілька робочих рухів. Інструменти, що мають замкові частини, занурюють розкритими, попередньо зробивши ними кілька робочих рухів для кращого проникнення вірусу в важкодоступні ділянки виробу в області замку. Надлишок суміші видаляють будь-яким способом (промокають за допомогою стерильного фільтрувального паперу, марлевою серветкою), але не протирають !! вироби. Тест-вироби підсушують при температурі $20^0 \pm 2^0\text{C}$ протягом 60-90 хв.

Визначення активної концентрації засобу і часу віруліцидної дії. Контаміновані вірусом вироби занурюють у дезінфектант на час дезінфекції (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 хв) або, при необхідності, на більш тривалий час, наприклад, 240 хв - для виробів одноразового застосування перед утилізацією.

Після закінчення часу дезінфекції вироби витягують з дезінфектанту. Канали промивають нейтралізатором, з поверхонь беруть змиви серветками розміром 5x5 см, змоченими нейтралізатором. Серветки, дрібні вироби занурюють у пробірки з намістом і з нейтралізатором (обсяг - 5 мл), які поміщують в шуттель-апарат на 10 хв.

Отриману змивну рідину вносять в пробірки або лунки планшет з культурою клітин.

Оптимальний час знезараження - не більше 60 хв, для виробів одноразового застосування - не більше 240 хв.

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження ендоскопів

Як досліджуваних об'єктів використовують гнучкий (гастроскоп), жорсткий (цистоскоп) ендоскопи або фрагменти гнучкого ендоскопа (гастроскопа) - його каналів і зовнішньої поверхні.

За допомогою піпетки вірусом контамінують поверхню і канали ендоскопа (або його фрагменти), потім їх занурюють в розчин ДЗ, заповнюючи ним канали виробу. Для імітації мінімального органічного забруднення до вірусу перед контамінацією тест-виробів додають 5% інактивованої сироватки. Через 5 - 60 хв тест-виріб витягають з розчину і беруть змив з його поверхні стерильною марлевою серветкою, змоченою нейтралізатором. Канали виробу промивають розчином нейтралізатора і залишають на 10 хв. Серветки поміщають в пробірки з нейтралізатором і скляними намистинами, відмивають в шуттель-апараті протягом 10 хв. Промивну - з каналів і змивну - з серветок рідини вносять у культуру клітин, відмиту від ростового середовища, залишають на контакт на 30-60 хв для адсорбції вірусу і додають підтримуюче середовище. При необхідності для уникнення цитотоксичної дії ДЗ клітини промивають розчином Хенкса і заливають підтримуючим середовищем з сироваткою. Клітини інкубують в термостаті при необхідній для конкретного вірусу температурі.

Оптимальний час знезараження - не більше 60 хв.

Особливості постановки експериментів з вивчення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження МВ в установках (мийно-дезінфекційні машини та ін.

Одним з найбільш значущих умов постановки експериментів щодо розробки або експертної оцінки режимів знезараження МВ в установках, наприклад, ультразвукових, мийно-дезінфікуючих машинах, є створення умов експерименту, максимально наближених до умов практичного застосування (відповідно до технічного паспорту та інструкції з експлуатації).

Принциповими є такі характеристики: швидкість руху (циркуляції) дезінфікуючого розчину; температура розчину, кількість (обм'єм) розчину, діаметр каналу (каналів) якими циркулює розчин. Підвищена температура розчинів ДЗ і примусова циркуляція підвищують їх активність, в кілька разів скорочуючи час знезараження МВ.

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження предметів догляду за хворими та іграшок

Визначення віруліцидної активності ДЗ при знезараженні предметів догляду за хворими. Предмети догляду за хворими можна поділити на 2 групи в

залежності від можливого забруднення біосубстратами і ступеня контамінації вірусами:

наконечники до клізм стикаються при їх використанні зі слизовою оболонкою прямої кишки, тому вимоги до їх обробки і критерії ефективності ДЗ такі ж, як до МВ. Органічне навантаження в експериментах повинно складати 40% сироватки, а спосіб знезараження - шляхом занурення в розчин ДЗ.

підкладні клейонки можуть бути забруднені будь-якими виділеннями, тому органічне навантаження повинно бути таке ж, як і в експериментах з МВ - 40%, а спосіб знезараження шляхом - занурення в розчин або одно-, при необхідності - дворазове протирання.

В якості тест-об'єктів, що імітують предмети догляду за хворими, використовують тест-поверхні розміром $10 \times 10 \text{ см}^2$, виготовлені з гумових ґрілок, пузирів для льоду, медичної клейонки, а також наконечники до клізм і ін., з різних матеріалів. Їх контамінують сумішшю вірусу з 40 % інактивованої сироватки. Наконечники до клізм контамінують вірусом за такою ж методикою, що і МВ, що мають канали, потім підсушують до повного висихання при температурі $20^0 \pm 2^0 \text{C}$.

Підготовлені тест-об'єкти протирають одноразово або дворазово з інтервалом 15 хв серветкою, змоченою розчином ДЗ. Крім того, тест-об'єкти, виготовлені з медичної клейонки, занурюють у дезінфікуючий розчин.

Дрібні предмети (наконечники до клізм і ін.) Занурюють в розчин ДЗ, заповнюючи ним порожнини і канали, уникаючи утворення бульбашок повітря. Через 30, 60, 90, 120 хв змиви беруть марлевими серветками розміром $5 \times 5 \text{ см}$, змоченими в нейтралізаторі. Предмети догляду, що мають канали, промивають нейтралізатором (не більше 5 мл), який збирають в стерильні пробірки і залишають на 10 хв для нейтралізації. Марлеві серветки занурюють в широкогорлі пробірки з намістом (з 5 мл нейтралізатора, приготованого на підтримуючому середовищі), які відмивають в шуттель-апараті протягом 10 хв. Оптимальний час знезараження предметів догляду за хворими - не більше 120 хв.

Визначення віруліцидної активності ДЗ при знезараженні іграшок. При знезараженні іграшок (дрібних і середніх) визначення віруліцидної активності ДЗ проводять при обробці способами протирання, занурення в розчин ДЗ або зрошення (для великих іграшок).

З цією метою іграшки (без отворів) контамінують вірусом з розрахунку 0,5 мл на 100 см^2 , але так, щоб вся їх поверхня була нею покрита. Дрібні

іграшки занурюють повністю у вірусмістку рідину. Потім їх підсушують при температурі 18-20⁰С до повного висихання.

Поверхню іграшок протирають серветкою, змоченою розчином ДЗ (в контролі - стерильною водою), дрібні іграшки занурюють в розчин ДЗ, перешкоджаючи їх спливання; великі іграшки зрошують розчином ДЗ. Норма витрати розчину ДЗ способом протирання 100 - 150 мл/м² при одноразовій обробці, способом зрошення - 150 мл/м² - 300 мл/м². При необхідності обробку способом протирання або зрошення повторюють через 5 - 15 хв.

Через певні проміжки часу (від 15 до 120 хв) за допомогою марлевої серветки (5х5 см), змоченої нейтралізатором, приготованому на підтримуючому середовищі або фізіологічному розчині, з іграшок беруть змиви. Серветки занурюють в пробірки зі скляним намистом і нейтралізатором. Оптимальний час знезараження - не більше 120 хв.

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження білизни, спецодягу, виробів з тканин тощо.

При визначенні віруліцидної активності ДЗ при знезараженні білизни враховують співвідношення розчину ДЗ і білизни: при особливо небезпечних інфекціях витрата розчину становить 5 л на 1 кг сухої білизни, при інших - 4 л розчину на 1 кг сухої білизни. Враховується також температура розчину, ступінь і характер забруднення білизни.

Визначення ефективності ДЗ при знезараженні білизни без наявних забруднень. Дослідження проводять за допомогою батистових тестів. Контаміновані вірусом тести підсушують при кімнатній температурі, потім їх закладають (по 5 штук в кожен) у бязеві стерильні мішечки розміром 5х8 см з пришитою до кута кожного з них міцної ниткою довжиною близько 0,5 м. Мішечки закривають у вигляді конверта.

Білизна (старі бязеві халати, рушники та ін.) Погружають в ємність з розчином ДЗ, послідовно замочуючи одну річ за іншою, стежачи за тим, щоб між речами не утворювалось повітряних прошарків, що перешкоджають процесу дезінфекції. Одночасно між шарами білизни розподіляють (зверху, в середині і внизу) мішечки з контамінованими вірусом тестами. Через певні проміжки часу (15-30-60 і більше хвилин) мішечки з тестами витягають одночасно з трьох шарів. Тести виймають з мішечка стерильним пінцетом, занурюють в широкогорлі пробірки з нейтралізатором і намистом, далі - як в підпункті 3.4.

Визначення віруліцидної активності ДЗ при знезараженні білизни, забрудненої кров'ю, фекаліями. З метою вивчення ефективності засобу при знезараженні білизни, забрудненої кров'ю (імітація у вигляді 40 % сироватки),

медичних відходів з тканин, марлі, вати (одноразова хірургічна білизна і акушерські комплекти, перев'язувальний матеріал, марлеві серветки, ватні тампони та ін.) До 6 мл вірусмісткої рідини додають 4 мл інактивованої СВРХ, змішують і заливають тести, підсушують їх і використовують в досліді (згідно з підпунктом 3.4.). Оптимальний час знезараження білизни - не більше 120 хв, медичних відходів - не більше 240 хв.

Для імітації забруднення білизни і медичних відходів з тканин і ін. фекаліями в експериментах з тест-вірусом використовують фекальну емульсію. Фекальну емульсію готують наступним чином: до 6 мл 10% вірусмісткої рідини додають 4 мл 40% емульсії фекалій. Для цього 8 г простерилізованих фекалій (1,5 атм протягом 30 хв) розтирають в ступці з 20 мл стерильної води. Як органічне навантаження можна використовувати також 80% інактивованої СВРХ з розрахунку: 8 мл сироватки і 2 мл вірусу, ретельно перемішують і цією сумішшю заливають тести. Надлишок рідини через 15 хв видаляють за допомогою піпетки, тести підсушують при кімнатній температурі. Далі експеримент проводять за схемою для незабрудненої білизни (згідно з підпунктом 3.4.). Оптимальний час знезараження білизни та медичних відходів, забруднених фекаліями - не більше 240 хв.

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження посуду, в тому числі лабораторного

Методика знезараження посуду без залишків їжі, а також без інших наявних забруднень. При знезараженні посуду без залишків їжі, лабораторного посуду без наявних забруднень в якості тест-об'єктів використовують тарілки, склянки, чашки; столові прилади - ножі, виделки, ложки; лабораторного посуду, піпетки, в т.ч. мікропіпетки, наконечники до них, предметні скельця, пробірки. Чистий посуд контамінують вірусом, який наносять піпеткою з розрахунку 0,5 мл на 100 см² і рівномірно розподіляють по поверхні за допомогою стерильного скляного шпателью. Виделки, ложки і ножі занурюють у вірусмістку рідину на 10 - 15 хвилин (за винятком ручок), канали піпеток контамінірують вірусом.

Посуд, столові прилади підсушують при кімнатній температурі. Після повного висихання занурюють в розчин ДЗ, повністю їх покриваючи (витрата розчину становить приблизно 2 л на комплект посуду: чашка, блюдо, 2 тарілки, ложка, виделка, ніж) розчином. Через певні проміжки часу (15, 30, 60, 90, 120 хвилин) посуд виймають з розчину ДЗ. Для оцінки ефективності знезараження стерильними марлевими серветками розміром 5x5 см (спочатку зволоженою нейтралізатором, потім сухою) ретельно протирають контаміновані вірусом частини кожного предмета. Серветки поміщають в

стерильну широку пробірку з намістом і з 5 мл стерильного нейтралізатора (підпункту 3.4.). Оптимальний час знезараження - не більше 60 хв. Контролем слугує аналогічним способом контамінований вірусом посуд, занурений на максимальну експозицію в стерильну або кип'ячену водопровідну воду.

Методика знезараження посуду із залишками їжі, а також забрудненого лабораторного посуду. Для вивчення ефективності ДЗ при знезараженні посуду із залишками їжі, забрудненого лабораторного посуду багаторазового використання та одноразового застосування (перед утилізацією) до вірусу додають 80% інактивованої СВРХ з розрахунку: 20% ВС і 80% сироватки, суміш наносять рівномірно на посуд, підсушують. Далі - як у підпункті 3.4. Оптимальний час знезараження - не більше 120 хв для посуду багаторазового використання і не більше 240 хв - для посуду одноразового застосування (перед утилізацією).

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження поверхонь

Визначення віруліцидної активності ДЗ при знезараженні тест-поверхонь вивчають двома способами: способом протирання (одно- або дворазового) або способом зрошення.

В експериментах використовують тест-поверхні розміром 10х10 см, гладкі, шорсткі, вбираючі і невбираючі ДЗ з різних матеріалів: дерев'яні, оштукатурені, пофарбовані масляною фарбою, обклеєні шпалерами, а також з лінолеуму, пластику, скла, кахлю, метласької плитки, фаянсу, штучної або натуральної шкіри та ін. Набір тест-поверхонь (далі «поверхонь») визначається призначенням засобу. Перед експериментом поверхні піддають механічному очищенню - миють водою з милом і щіткою, за виключенням поверхонь, обклеєних шпалерами і забарвлених клейовою фарбою. Останні протирають кілька разів стерильною серветкою, зволоженою стерильною водопровідною водою. Після підсихання поверхні розташовують горизонтально і піпеткою наносять врусмістку рідину з розрахунку - 0,5 мл з додаванням 5 % інактивованої СВРХ на площу в 100 см², рівномірно розподіляють по поверхні скляним шпателем. Контаміновані вірусом поверхні підсушують до повного висихання при температурі 20° С + 2° С і відносній вологості повітря 50- 60%, потім обробляють розчином ДЗ.

При знезараженні контамінованих вірусом поверхонь деяких видів - оштукатурені, пофарбовані, обклеєні шпалерами, зі скла, фаянсу, дерева, пофарбовані олійною фарбою, з кахлю, їх розташовують вертикально і проводять обробку в цьому положенні (спосіб зрошення). Решту поверхонь обробляють як в горизонтальному (спосіб одноразового або дворазового

протирання), так і у вертикальному положеннях. Розчин ДЗ наносять на поверхню шляхом зрошення з пульверизатора, слідкуючи за кількістю витраченої рідини. Норма витрати - від 80 до 500 мл розчину на 1 м² оброблюваної площі.

Для імітації органічного забруднення використовують 40% інактивованої сироватки при розробці режимів знезараження раковин, ванн або при розробці режимів знезараження унітазів - 80%. Можливо також використання вірусвмісткої фекальної емульсії, яку наносять на поверхні з кахлю або фаянсу в експериментах з вірусами, що виділяються з організму з фекаліями. Контроль ефективності знезараження здійснюють через 15-30-60 хвилин. Проби відбирають шляхом ретельного протирання зрошуваних розчином ДЗ поверхонь злегка зволоженою нейтралізатором в фізіологічному розчині або розчині Хенкса з антибіотиками стерильною марлевою серветкою (5x5 см), а потім сухою. Серветки поміщають в широкогорлі пробірки з намістом з 5 мл нейтралізатора (пункт 3.4.). Оптимальний час знезараження поверхонь - не більше 60 хв.

В контролі вірусу контаміновані поверхні протирають або зрошують стерильною або кип'яченою водопровідною водою при тій же нормі витрати води, що і ДЗ в досліді. Забір проб та їх обробку проводять аналогічно дослідним. Для визначення щільності контамінації проводять титрування змивів з поверхонь.

Визначення віруліцидної активності ДЗ, призначених для знезараження виділень (сеча, фекалії, мокротиння) і крові

При визначенні віруліцидної активності ДЗ для знезараження сечі підбирають концентрацію ДЗ і час обробки. Розчини ДЗ додають до продезінфікованої способом кип'ятіння сечі в рівному або подвійному обсязі. Через 15, 30, 60 хвилин зазначену суміш в кількості 1 мл переносять в пробірки з 5 мл нейтралізатора, перемішують, залишають на 10 хв для нейтралізації, потім заражають культуру клітин. Культуру клітин, відмиту від ростового середовища, залишають на контакт на 30-60 хв для адсорбції вірусу. Потім клітини промивають розчином Хенкса і заливають підтримуючим середовищем з сироваткою. Клітини інкубують в термостаті при оптимальній для конкретного вірусу температурі.

В контролі до сечі додають не дезінфікуючий розчин, а стерильну воду. Результати дослідів враховують в порівнянні з контролем. Кількість вірусу в сечі в контролі визначають титруванням. Оптимальний час знезараження - не більше 120 хв.

При розробці режимів знезараження фекалій враховують співвідношення ДЗ і знезаражувану масу фекалій, час обробки, консистенцію знезаражуваних виділень, ступінь гомогенізації в процесі знезараження.

З цією метою 20 г простерилізованих фекалій розтирають у ступці з додаванням 80 мл води до отримання гомогенної емульсії. Емульсію розливають по 9 мл в пробірки і додають по 1 мл вірусвмісткої рідини.

Приготовану емульсію фекалій заливають рівним об'ємом ДЗ або подвійною кількістю розчину ДЗ і надалі беруть проби так само, як і при знезараженні сечі. Взяті проби центрифугують при 2500-3000 об/хв протягом 20 хвилин, після чого надосадовою рідиною заражають культуру клітин, вносячи її в пробірки/лунки з клітинами. В контролі замість розчину ДЗ використовують стерильну воду. Результати враховують в порівнянні з контролем. Оптимальний час знезараження - не більше 240 хв.

При розробці режимів знезараження крові (без згустків) використовують цитратну (або дефібриновану) кров, контаміновану тест-вірусом (співвідношення об'єму крові і вірусної суспензії 1: 1). Можна також використовувати еритроцитарну масу (баранячі еритроцити), яка готується шляхом додавання до 3 мл відмитої еритроцитарної маси 97 мл 3,0% розчину альбуміну на фосфатному буфері. Аліквоти цієї суміші контамінують тест-вірусом. Підбирають оптимальне співвідношення ДЗ і знезаражуваної крові, концентрацію ДЗ, час обробки, нейтралізують (1: 1, тобто 1 об'єм суміші крові і ДЗ і 1 об'єм нейтралізатора) витримують 5-10 хв (перемішуючи або струшуючи) і використовують для визначення інфекційності тест-вірусу. Для знезараження крові зі згустками ефективним є тільки термічний метод обробки (в паровому стерилізаторі). Оптимальний час знезараження - не більше 240 хв.

При розробці режимів знезараження мокротиння використовують мокроту волонтерів, підбирають оптимальне співвідношення ДЗ і знезаражувного мокротиння, час обробки, концентрацію ДЗ, нейтралізатор. Оптимальний час знезараження - не більше 240 хв.

3.5. Визначення віруліцидної активності шкірних антисептиків

Для вивчення віруліцидної активності шкірних антисептиків використовують суспензійний метод (згідно з підпунктом 3.3.) Або метод батистових тест-об'єктів (згідно з підпунктом 3.3.). З цією метою використовують поліовірус та аденовірус в кількості 10^5 ТЦД₅₀/мл. Час дезінфекції не повинен перевищувати 4 хв. Ефективність - зниження титру вірусу не менш, ніж на $4 \log_{10}$.

3.6. Визначення віруліцидної активності антимікробних тканин, лакофарбових матеріалів

При визначенні віруліцидної активності антимікробних тканин вибір тест-вірусу і тест-об'єкта залежить призначення і сфери застосування, наприклад, марлеві пов'язки для захисту верхніх дихальних шляхів професійного контингенту (медичні працівники, продавці в супермаркетах та ін.) або виготовлення спецодягу тощо. З цією метою на тест-об'єкти (по два на кожне розведення), виготовлені з досліджуваної тканини розміром 2x2 см крапельно наносять по 0,05 мл вірусмісткої рідини. Через 30 сек, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 хв тест-об'єкти переносять в широкогорлі пробірки з намістом і з 5 мл нейтралізатора, відмивають в шуттель-апараті протягом 10 хв. Змивною рідиною заражають культуру клітин. Далі - культуру клітин, відмиту від ростового середовища, залишають на контакт на 30-60 хв для адсорбції вірусу. Потім клітини промивають розчином Хенкса і заливають підтримуючим середовищем з сироваткою. Клітини інкубують в термостаті при оптимальній для конкретного вірусу температурі. В контролі використовують тест-об'єкти з аналогічної тканини, але ті, що не містять противірусних речовин. Критерії віруліцидної активності - зниження титру вірусу не менше, ніж на $4 \log_{10}$.

Визначення віруліцидної активності лакофарбових матеріалів. При визначенні віруліцидної активності лакофарбових матеріалів (антимікробні лаки, фарби) вірус в дозі 10^5 ТЦІД₅₀/мл наносять в кількості 0,5 мл на досліджувану тест-поверхню (розмір 10x10 см²). Після необхідної експозиції (від 30 хв до 24 годин) з поверхні беруть змив стерильною марлевою серветкою, змоченою нейтралізатором. Серветки занурюють в широкогорлі пробірки з 5 мл нейтралізатора і намістом, відмивають протягом 10 хв в шуттель-апараті (підпункт 3.4.). В якості контролю використовують тест-поверхні, пофарбовані фарбою або покриті лаком, що не містять віруліцидної речовин.

Визначення пролонгованої віруліцидної дії лакофарбових матеріалів проводять на тест-поверхнях без додаткової і з додатковою штучною контамінацією тест-вірусом. Критерії віруліцидної активності лакофарбового покриття - зниження кількості вірусу не менш, ніж на $4 \log_{10}$ через 24 години після нанесення його на поверхню; спостереження може тривати протягом 6 місяців і більше.

V. ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ІНСЕКТИЦИДНИХ ТА РОДЕНТИЦИДНИХ ЗАСОБІВ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В СФЕРІ ДЕЗІНФЕКЦІЇ

1. Вступ

Для захисту від синантропних членистоногих і гризунів, які викликають безпосередню епідеміологічну та епізоотичну небезпеку, наносять суттєві збитки, а також є факторами антисанітарного стану населених пунктів і дискомфорту життя людей, широко використовують інсектицидні та родентицидні засоби.

При застосуванні у практиці дезінсекції (у закладах охорони здоров'я, підприємствах, організаціях, побуті тощо) впроваджуються дезінфекційні засоби різноманітної препаративної форми (розчини, концентрати емульсій і суспензій, порошки (дusti), гелі, наповнювачі аерозольних упаковок і безпропелентних аерозольних упаковок (далі - БАУ), отруйні принади (зернові, тістоподібні, парафіновані брикети), фумігатори, спіралі та інш.) гарантованої якості, ефективності, безпеки.

Засоби, які використовують для знищення шкідливих членистоногих або гризунів, поділяють у залежності від способу, шляху знаходження до організму та їх основної дії на кишкові, контактні, фумігантні та системні. В той же час, цей розподіл умовний - в багатьох випадках дія засобу може бути змішаною, а саме: контактно-кишковою, контактно-фумігантною тощо, в залежності від препаративної форми засобу, його діючої речовини та способу застосування.

Для адекватної оцінки ефективності інсектицидних та родентицидних засобів на відповідних цільових об'єктах необхідно впроваджувати стандартні методичні підходи при дослідженні їх специфічної біологічної активності.

Визначення ефективності засобу проводиться з використанням препаративної форми і її склад, в якому вказані всі компоненти та їх співвідношення, обов'язково надається у звітах з ефективності.

Будь-які літературні дані щодо ефективності подібних за складом засобів розглядаються лише як допоміжні і не можуть замінити дані щодо ефективності конкретного засобу, отримані в результаті досліджень, що були проведені відповідно до рекомендованих методів.

Інформація щодо ефективності та цільового призначення засобу разом з даними про його діючу речовину має бути достатньою для того, щоб оцінити та визначити умови застосування, а також переваги в результаті його використання у порівнянні з вже існуючими засобами.

Метою цього документу є надання рекомендацій щодо методичних підходів, критерій оцінки та методів дослідження ефективності інсектицидних та родентицидних засобів, що рекомендуються до використання в сфері дезінфекції. Дані рекомендації є результатом аналізу існуючих в Україні та світі робіток щодо дослідження інсектицидних та родентицидних засобів.

Цей документ призначений для фахівців лабораторій, що займаються тестуванням і дослідженням ефективності різних препаративних форм зазначених засобів.

2. Визначення специфічної активності інсектицидних засобів

2.1. Загальні положення

Для знищення синантропних членистоногих використовують інсектицидні засоби, діючі речовини яких належать до різних класів хімічних сполук – фосфор- і хлороорганічні сполуки, піретрини і піретроїди, карбамати, фенілпіразоли, аміногідрозони, неоникотиноїди, авермектини, спиносини тощо. Для одержання коректних, репрезентативних і достовірних даних при проведенні випробувань використовують стандартні лабораторні культури комах. Для експериментів потрібні однорідні партії біоматеріалу певного віку, статі.

Факторами, що враховуються під час оцінки ефективності інсектицидного засобу для боротьби з комахами та іншими членистоногими, є:

цільовий організм, який підлягає контролю;

препаративна форма засобу, (наприклад, рідина/порошок/принада);

сфера використання засобу (сфери життєдіяльності людини, а саме - у закладах охорони здоров'я, підприємствах, організаціях, транспорті, у житлових будинках та території навколо них, в приміщеннях приготування, переробки та зберігання продуктів харчування та напоїв, розміщення тварин, у побуті тощо).

Для оцінки ефективності засобу необхідно проводити лабораторні та практичні випробування з досліджуваними організмами. Визначення специфічної активності інсектицидних засобів має проводитись з врахуванням національних та міжнародно визнаних методів досліджень (ISO, CEN, OECD, WHO тощо). На теперешній час, в міжнародній практиці досліджень специфічної активності інсектицидних засобів використовують ряд стандартних методів (Додаток 35).

В той же час, дані вказівки щодо дослідження специфічної активності інсектицидних засобів розроблені таким чином, щоб вони були гнучкими і не визначали жорстких протоколів згідно яких необхідно проводити дослідження.

Якщо вказівки або інструкції не підходять, заявник може використовувати свої власні методи (Стандартні внутрішні операційні процедури), за умови, що використані методи досліджень затверджені на національному рівні, умови випробувань чітко та повністю описані, а результати досліджень відтворювані та дають повну оцінку ефективності засобу.

Необхідно підкреслити важливість контрольних експериментів при дослідженні специфічної ефективності. Негативний контроль (без діючої речовини) повинен бути включений у всі лабораторні дослідження. Випробування з негативним контролем зазвичай мають бути такого ж розміру (тобто кількості повторень), як і сам тест, щоб зробити можливим статистичне порівняння та отримати справедливе враження про ефективність засобу.

В той же час, вже досліджений інсектицидний засіб, що проявляє високу специфічну активність на даному виді комах може бути включений в протокол лабораторних досліджень як позитивний контроль.

При розробці методів досліджень слід враховувати різні фактори, наприклад, кількість членистоногих необхідних для тестування (комах, кліщів тощо). Кінцевою метою повинна бути розробка методів, які регламентують кількість комах, але, з іншого боку, будуть інформаційними. Перед проведенням досліджень необхідно встановити чисельність комах в групі, досліджувальні дози засобу, а також кількість повторень в експерименті. Зазвичай достатньо провести 4-5 повторних тестів на кожному рівні дози, використовуючи 10 (або 20) тестових членистоногих у кожній. Розмір вибірки повинен бути адекватним для виявлення відмінностей між групами (досліду та контролю) зі статистичною вірогідністю не менше 80%.

Для кожного засобу при проведенні досліджень з визначення специфічної активності повинна надаватись наступна інформація щодо:

назви діючих речовин та їх концентрації;

даних про те, що очікується від тесту, а саме що слід визначити і з якою точністю.

опису умов випробувань (розмір клітки, площа підлоги, наявність (альтернативної) їжі, води, температура, місцезнаходження, погодні умови);

можливості організмів, що випробовуються, акліматизуватися до умов випробувань перед випробуванням;

кількості досліджуваних організмів (розмір вибірки);

опису популяційного складу (самці, самки, личинки, вік популяції чи покоління тощо);

даних щодо походження тестового штаму;
 даних щодо тестових та контрольних результатів;
 розміру тестової сукупності до і після випробування;
 опису методів моніторингу, що застосовувались до, під час і після випробування;
 статистичних методи, якщо це доречно;
 проекту етикетки.

Надані в заявці дані щодо ефективності засобу на цільових організмах повинні відповідати даним, отриманим в результаті проведених досліджень.

Вимоги щодо підходів з визначення специфічної активності інсектицидних засобів можуть відрізнятися в залежності від сфери використання засобу - для професійного використання (в закладах охорони здоров'я, промисловості, на транспорті тощо) та населенням у побуті. Так, для інсектицидних засобів, що рекомендуються для професійного використання завжди необхідно проводити практичні випробування (в місцях застосування), для засобів, що рекомендуються до застосування у побуті достатньо лабораторних тестів.

Більшість членистоногих є активними в нічний час, і знищити їх при безпосередньому застосуванні інсектицидного засобу (наприклад спрею) не вдається. З цієї причини, в багатьох інсектицидних засобів в якості активного інгредієнту передбачається використання відносно стійких хімічних речовин. Інсектицидні засоби на їх основі призначені залишатися ефективними від декількох тижнів до кількох місяців після застосування, тобто вони мають високу залишкову активність. Залишкова активність - це термін, який описує період, впродовж якого засіб буде присутній у достатній кількості для знищення цільових організмів, які контактують із ним впродовж тривалого періоду часу, щоб отримати смертельну дозу. В зв'язку з чим, кількість залишків засобу, що осідає на оброблених поверхнях, є критично важливою при застосуванні багатьох інсектицидних засобів проти повзучих/літаючих комах. В ідеалі кількість залишку засобу повинна визначатися або шляхом розрахунку, або за фактичними результатами вимірювань (при імітуванні умов використання). Метод (и) визначення залишкових кількостей засобу повинні використовуватись під час проведення досліджень із визначення ефективності засобу. Зазвичай лабораторне тестування проводиться для встановлення ефективності безпосередньо після нанесення та в кінці залишкової кількості засобу. Необхідно при проведенні таких досліджень приймати до уваги типи поверхонь, на яких застосовують засіб, оскільки тип поверхні має виражений вплив на кількість активного залишку, доступного комахам. Загалом, ряд

поглинаючих і не поглинаючих поверхонь (вінільна плитка або лінолеум, нержавіюча сталь, пофарбована і нефарбована деревина, килим, бетон і керамічна плитка тощо) повинен бути перевірений при розробці рекомендацій (інструкцій) щодо використання засобу.

2.2 Визначення специфічної активності інсектицидних засобів для боротьби з повзаючими комахами

Тест-об'єкти для досліджень

До комах, що повзають, належать таргани, мурахи, блохи, цвіркуни, клопи тощо. Вплив інсектицидних засобів на цих комах головним чином ґрунтується на прямому контакті з засобом або на його пероральному споживанні у вигляді принади.

В зв'язку з тим, що серед комах, що повзають, тарганів найважче контролювати, в якості модельного тест – об'єкту при дослідженні специфічної біологічної активності засобів проти комах, що повзають, використовують лабораторну культуру рудого таргана (*Blattella germanica* L.). Випробування на тарганах, як правило, слід проводити з двома ключовими видами, одним маленьким, одним великим, наприклад, німецьким тарганом (*Blattella germanica*) або тарганом східним (*Blatta orientalis*) або американським тарганом (*Periplaneta americana*).

При цьому, у разі подання документів на отримання реєстрації на засіб із декларацією щодо "знищення комах, що повзають", засіб, що продемонстрував достатню ефективність відносно тарганів, також може бути дозволений для застосування проти інших комах, що повзають. Однак, якщо також заявлено про знищення популяції та / або гнізда, інші види (наприклад мурашки) також повинні протестовані.

Таргани

Таргани є поширеною та нагальною проблемою у багатьох сферах життєдіяльності людини. Вони на частинах свого тіла переносять збудників інфекцій та можуть забруднювати харчові продукти своїми виділеннями. Серед мікроорганізмів, що вони переносять – це бактерії *P. vulgaris*, *E. coli*, *B. Pyogenes*, *S. aureus*, збудники черевного тифу та інших сальмонельозів, туберкульозу тощо. Таргани та продукти їх життєдіяльності також викликають алергію та астму, особливо, у дітей.

Таргани належать до (під) виду *Blattodea*. В світі зареєстровано понад 3500 видів тарганів, з них рудий тарган (*Blattella germanica*) є найпоширенішим.

Запліднена самка рудого таргана за раз відкладає від 28 до 56 яєць у особливий кокон (капсулу). Після вилуплення з капсули таргани починають

свою личиночну стадію. Личинка проходить 6 ліньок. Загальна тривалість розвитку може зайняти тижні або місяці в залежності від виду та умов навколишнього середовища. За незначної вологості, достатньої кількості їжі та температурі 22 °C повний цикл розвитку личинок триває 4-8 місяців. Дорослі особини живуть близько 6 місяців (в лабораторних умовах довше).

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти тарганів

Інсектицидний засіб проти тарганів може бути дозволений лише у тому випадку, коли він має достатній рівень ефективності. Це реалізується якщо можна досягти наступних результатів:

Засоби, що призначені для використання при обробці поверхні або аерозолі для споживачів:

необхідні результати в лабораторних тестах та в процесі практичних досліджень:

≥ 90% летальності впродовж декількох хвилин після контакту з засобом або безпосередньо після розпилення та наприкінці заявленого залишкового періоду;

летальність у відповідність до використання згідно з інструкцією, переважно ≥90% за 24 години. Інсектицидні засоби, що призначені для використання при обробці поверхні або аерозолі що використовуються в професійній сфері.:

необхідні результати в лабораторних тестах:

пряме застосування: 100% летальність впродовж 1 години після обприскування тарганів, смертність від 90 до 100% може бути прийнята за умови надання кваліфікованого пояснення відсутності загальної летальності;

залишковий тест: 100% летальність впродовж 24 годин після розміщення тарганів у дослідній зоні, безпосередньо після обприскування та наприкінці заявленого залишкового періоду. Смертність між 90 і 100% може бути прийнята за умови кваліфікованого пояснення відсутності загальної летальності.

Продукти, призначені до використання при загальній обробці поверхні або аерозолі з вимогою щодо контролю популяції або вторинного вбивства:

необхідні результати в лабораторних тестах та випробуваннях в процесі практичних досліджень:

≥ 90% летальності впродовж періоду випробувань, безпосередньо після розпилення та наприкінці заявленого залишкового періоду;

Продукти, призначені для використання в якості принади:

необхідні результати лабораторного тесту на вибір смаку (принада та альтернативна їжа):

принаймні 95% досліджуваних комах було вбито під час експерименту;

необхідні результати, отримані в процесі практичних досліджень:

≥ 90% скорочення кількості комах впродовж кількох тижнів;

Продукти на основі регуляторів росту комах (IGR):

необхідні результати в лабораторних тестах:

принаймні 95% комах не розвивається до наступної стадії розчитку;

необхідні результати в тестах на моделювання:

≥ 90% скорочення кількості комах впродовж кількох тижнів;

Відхилення від цих норм можливе, але воно повинно бути виправданим та обґрунтованим. Отримані результати повинні забезпечувати докази відповідних рівнів ефективності впродовж заявленого залишкового періоду.

Мурашки

Мурашки можуть мешкати та спричиняти незручності як в приміщенні, так і зовні. В Україні поширені такі види мурашок:

Руда хатня мурашка (*Monomorium pharaonis*).

Чорна садова мурашка (*Lasius spp.*, *L. Niger*)

Тротуарна мурашка (*Tetramorium caespitum*)

Червона мурашка (*Myrmica rubra*).

В залежності від мети випробувань також використовують природну популяцію рудих хатніх мурашок (*Monomorium pharaonis*) або чорних садових мурашок (*Lasius niger*).

Мурашки живуть гніздами, у кожному є самки, самці і робочі мурашки. Самки живуть близько 15 років. Самки відкладають яйця, з яких вилуплюються личинки. Тривалість розвитку личинки залежить від умов зовнішнього середовища. Перед окуклюванням личинка будує кокон і перетворюється на лялечку. Робочі мурашки охороняють личинки та допомагають мурашці вилупитися із кокона.

Руді хатні мурашки повзаючи по інфікованому матеріалі в приміщенні, де є тяжкохворий, можуть механічно переносити збудників інфекційних хвороб, зокрема, збудників черевного тифу, дизентерії, чуми тощо.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти мурашок

Інсектицидний засіб проти мурашок зазвичай вважається достатньо ефективним, якщо можна досягти наступних результатів:

Засоби, призначені для використання в якості загальної обробки поверхонь для споживачів:

необхідні результати отримані в лабораторних тестах на летальність та в умовах практичних досліджень (моделювання):

≥ 90% летальність за 5 -10 хвилин (або згідно з вимогою), безпосередньо після обприскування мурашок та наприкінці залишкового періоду;

летальність переважно ≥90% через 24 години. Засоби, призначені для професійної обробки поверхні:

необхідні результати в лабораторних тестах:

пряме застосування: 100% летальність впродовж 24 годин після обприскування мурашок, смертність між 90 і 100% може бути прийнята за умови надання кваліфікованого обґрунтування;

дослідження залишкової активності: ≥ 90% летальності впродовж 24 годин після розміщення мурашок у дослідній зоні, безпосередньо після обприскування та наприкінці залишкового періоду;

Засоби, призначені для обробки поверхонь з метою знищення гнізда:

лабораторні дослідження:

100% летальність впродовж всього періоду досліджень, безпосередньо після розпилення та наприкінці залишкового періоду;

необхідні результати в тестах на моделювання:

≥ 90% летальності впродовж періоду випробувань, включаючи мурах у гнізді;

Засоби, призначені для використання в якості приманки:

необхідні результати лабораторного тесту на вибір смаку (принада та альтернативна їжа):

принаймні 95% досліджуваних комах загино під час експерименту;

необхідні результати в модельних тестах:

≥ 90% скорочення кількості мурашок впродовж кількох тижнів після

застосування;

Відхилення від цих норм можливі, але повинні бути обґрунтовані.

Постільні клопи

Клопи - це маленькі безкрилі комахи, що живлять кров. Клопи відносяться до виду *Hemiptera*, родини *Cimicidae*. З багатьох визнаних видів, лише три, як відомо, харчуються людиною. У регіонах з помірним кліматом України домінуючим видом є *Cimex lectularius*. Невідомо, що клопи передають

хвороби, але інвазії можуть викликати хворобливі та дратівливі укуси на шкірі під час сну. Після зараження, лікування та контроль дуже важкі.

Ознакою присутності клопів є укуси на відкритій шкірі (невеликі червоні сверблячі шишки) людини під час сну. Якщо спостерігати, обмежені місця, такі як накладки для матраців або склади меблів, повинні бути оглянуті на предмет виявлення плям у фекаліях та наявності клопів.

Клопи ховаються в тріщинах на стінах, меблевих з'єднаннях, за малюнками і в швах меблів тощо. Клопи негативно фототактичні і зазвичай їх не помічають за межами пристані вдень або при включенні вогнів.

Самки клопів впродовж життя можуть відкласти до 500 яєць. Залежно від частоти прийомів крові, клопи можуть прожити більше року. Вони здатні виживати місяцями без їжі (залежно від температури: при 16 ° C виживання може становити рік). Перша личинка висиджується з маленьких білих яєць через 7-10 днів при кімнатній температурі (близько 20 ° C) і раніше при більш високій температурі. Кожна з 5 личиночних стадій потребує кров'яної їжі, щоб завершити розвиток до наступного етапу. Весь життєвий цикл від яйця до яйця займає мінімум 28 днів при 27 ° C або близько 42 днів при 22 ° C.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти постільних клопів

Інсектицидний засіб, призначений для боротьби з клопами, вважається достатньо ефективним, якщо досягнуті наступні результати:

Засоби, призначені для використання в якості загальної обробки поверхні для споживачів:

необхідні результати в лабораторних тестах та при моделюванні умов застосування:

- ≥ 90% летальності впродовж декількох хвилин після контакту з засобом, безпосередньо після нанесення та в кінці залишкового періоду;
- летальність при застосуванні у відповідності з інструкцією переважно ≥ 90% за 1 годину.

Засобом, призначені для професійної обробки поверхні:

необхідні результати в лабораторних тестах:

- пряме застосування: 100% летальності впродовж 24 годин після обприскування поверхонь;
- залишковий тест: ≥ 95% летальності впродовж 24 годин після розміщення клопів у тестовій зоні, безпосередньо після обприскування та наприкінці залишкового періоду.

необхідні результати в практичних дослідженнях:

через 6-10 тижнів зменшення чисельності клопів перевищує 90% щодо необроблених ділянок або рівнів попередньої обробки.

Повторена обробка, як правило, необхідна для боротьби з клопами. Після закінчення обробки необхідно досягти 100% ефективності.

Відхилення від цих норм можливі, але повинні бути обгрунтовані.

При проведенні досліджень на практиці якщо середнє скорочення чисельності клопів перевищує 90% відносно будь-яких необроблених ділянок або рівнів попередньої обробки, засіб вважається ефективним, але дослідник повинен оцінити дані кожного експерименту та врахувати всі фактори, перш ніж зробити висновок щодо ефективності засобу.

Кліщі

Кліщі - це невеликі членистоногі, що разом з павуками відносяться до класу Арахніда. Усі кліщі харчуються кров'ю. Деякі види кліщів відомі тим, що переносять і передають багато різних патогенних мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси, паразити та грибки. Захворювання, пов'язані з передачею кліщів в Україні, включають хворобу Лайма, енцефаліт, що передається кліщем, і анаплазмоз людини, які передаються *Ixodes ricinus*. Кліщі також відіграють важливу роль у здоров'ї тварин. Вони можуть викликати анемію, зниження вироблення молока та збільшення маси тіла тварин.

Кліщі відрізняються морфологічно від комах, що мають дві основні частини тіла (у комах три) і вісім ніг як личинки, так і дорослі (шість ніг для комах). Кліщі проходять чотири етапи, щоб завершити свій життєвий цикл: яйце, личинка, личинка та дорослий кліщ. Годування відбуватиметься як у незрілому, так і у дорослому стадіях. Після спаровування самки жорстких кліщів будуть згодовуватися ще з наступною яйцекладкою сотень і навіть тисяч яєць.

Кліщів можна класифікувати на дві основні родини: м'які кліщі (*Argasidae*) та жорсткі кліщі (*Ixodidae*). Жорсткі кліщі- овечий кліщ (*Ixodes ricinus*), бурий собачий кліщ (*R. sanguineus*) та *Dermacentor sp. N. Marginatum*. Жорсткі кліщі відрізняються кількістю господарей - можуть мати від одного до трьох різних господарів. Після спаровування самки жорстких кліщів можуть відкласти сотні і навіть тисячі яєць.

Кліщі *Ixodes ricinus* під час пошуку можливого господаря, як правило, залишаються нерухомими, поки він не пройде повз. Після приєднання кліщі шукають місце для прикріплення. Зазвичай кліщі прикріплюються до шкіри людини вздовж штанив або шарпеток або інших щільних місцях, теплих і вологих. Час надходження на господарі може бути від години до декілька

днів, в залежності від виду. У жорстких кліщів споживання крові може тривати п'ять днів, тоді як м'які кліщі не фіксуються на господарях і прийом їжі в них закінчується за 20 - 50 хвилин.

М'які кліщі мають такі ж тіла, як і жорсткі кліщі. Ключові відмінності полягають у тому, що м'яким кліщам не вистачає склерозованої зовнішньої кутикули, яка є у жорстких кліщів, а ротові частини м'яких кліщів розташовані нижче кінця тіла (ротові частини твердих кліщів стирчать спереду захищеної кришки). М'які кліщі - це пташині кліщі (*Argas reflexus* та *A. Persicus*), які можуть нанести значну шкоду на птахофабриках.

Пташині кліщі (*Argas reflexus* та *A. Persicus*) широко поширені в теплих кліматичних умовах. Кліщ *A. persicus* зустрічається на невеликих птахофабриках, де живиться кров'ю курей та інших домашніх птахів. Кліщ *A. reflexus* поширений на голубиних фермах, на міських голубах. Кліщі можуть потрапляти з гнізд голубів до горищних та горищних приміщень і харчуватися кров'ю сплячих людей. Кліщ *A. рефлекс* - шкідник, що паразитує на міських голубах і може викликати широкий спектр алергічних реакцій. Без їжі дані кліщі здатні вижити впродовж двох років.

Дослідження засобів, що рекомендують для захисту від кліщів, зазвичай необхідно проводити на овечому кліщі *Ixodes ricinus*. Коли необхідно дослідити засіб з відлякування собак або пташиних кліщів, слід проводити випробування на кліщах *Rhipicephalus sanguineus* та *A. Reflexus*. Якщо засіб призначений для використання на птахофабриках, дослідження слід проводити на кліщі *A. persicus*.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти кліщів

Інсектицидні засоби проти кліщів, як правило, вважаються достатньо ефективними, якщо досягаються наступні результати:

Репеленти:

≥ 90% кліщів відлякуються впродовж заявленого періоду ефективності;

Засоби, що викликають летальність:

100% летальність кліщів до споживання крові;

≥ 80% летальність кліщів впродовж 24 годин після застосування засобу;

Відхилення від цих норм можливо, але повинно бути обгрунтоване.

Комахи, що нищать текстиль (включаючи хутро та тканини, що приваблюють комах)

Інсектицидні засоби проти комах, що нищать текстиль (включаючи хутро та тканини, що приваблюють комах), можуть застосовуватися при професіональному використанні та пересічними громадянами в побуті.

Засоби для застосування у побуті можуть використовуватися в першій фазі для запобігання контакту молі з збереженим одягом (шляхом вбивання, відштовхування або залучення молі в пастки), або інсектицидні засоби можуть бути нанесені на поверхню одягу для знищення посадкової молі при контакті.

Також інсектицидні засоби можуть бути використані в текстильній промисловості для профілактичної обробки..

Два основних роди, що відносяться до комах, які нищать текстиль - це *Lepidoptera* (моль) та *Coleoptera* (жуки). Кімнатна міль (*Tineola bisselliella*), хутряна міль (*Tinea pellionella*), насіннєва міль (*Hofmannophila pseudospretella*) та килимова міль (*Anthrenus* sp., *Anthrenocerus* sp.) - поширені домашні шкідники, які харчуються одягом, тканинами, килимом та ін., інші - натуральними волокнами хутра/вовна.

Міль, що харчується одягом найпоширеніша по всьому світу. Вона живиться під час личинкового циклу (в шовковому коконі, прикріпленому до волокон хутра/вовна. Личинки молі, які харчуються лише натуральними волокнами, такими як вовна, хутро, не харчуються, шовком, бавовною, білизною або синтетичними волокнами. Дорослі особини не їдять, вони відкладають яйця безпосередньо на харчове джерело з натуральних волокон. Личинки килимового жука (наприклад, *Anthrenus* sp., *Anthrenocerus* sp.) знищують вовну, килими та м'які меблі тощо. Дорослі особини, які харчуються нектаром та пилом, зазвичай можуть заносити додому рослини, квіти та іншу рослинність. Потім яйця відкладаються на ворсинках в захищених місцях, таких як плінтуси. Після вилуплення личинки починають харчуватися природним текстилем або експонатів (роги тварин копита, колекції комах тощо).

Засіб проти комах, що атакують текстиль, зазвичай слід випробовувати на: одному із видів молі:

кімнатна міль (*Tineola bisselliella*);

хутряна міль (*Tinea pellionella* L.);

насіннєва міль (*Hofmannophila pseudospretella*);

одному із видів килимової молі:

Anthrenus sp;

Anthrenocerus sp.

В залежності від вимог, що вказані на етикетці слід визначитись чи необхідно проводити тестування на дорослих комах, личинках чи на обох.

Для оцінки ефективності інсектицидного засобу зазвичай необхідно проводити і лабораторні та модельні випробування.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти комах, що нищать текстиль

Інсектицидний засіб може бути дозволений до використання лише у тому випадку, коли він має достатній рівень ефективності. Це реалізується для текстильних комах, як правило, наступним чином.

Наприкінці періоду експозиції (наприклад, 1 тиждень):

більше 90% дорослих та личинок повинні бути вбиті;

репелент повинен діяти відповідно до даних викладених на етикетці, переважно > 90%.

Відхилення від цих норм можливі, але повинні бути обгрунтовані.

Методи оцінки специфічної активності інсектицидних засобів для боротьби з повзаючими комахами

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних харчових принад для боротьби з тарганами та мурашками

Оцінку специфічної інсектицидної активності твердих (кульки, таблетки у контейнерах) та м'яких (гелей, пасти) харчових принад проводять в лабораторних умовах на тарганах *Bl. germanica* з інсектарної культури або хатніх рудих мурашок, чорних садових мурашок з природних популяцій.

Експерименти проводять методом вільного гуртового годування з можливістю вибору альтернативної їжі у лабораторному приміщенні при температурі повітря $(21 \pm 2) ^\circ\text{C}$, відносній вологості 60–70 %.

Для проведення дослідів з активності засобу використовують пластикові ємності розміром 28 x 22 x 16 см з вертикальними стінками, які зверху з внутрішнього боку змащують сумішшю вазеліну з вазеліновою олією для запобігання втечі тарганів і мурашок. Укриттям для комах слугує нижня частина темних пластикових пляшок (0,5 л) з отворами, які вирізають на бічних стінках для входу та виходу піддослідних особин. Альтернативна їжа – розмочений пшеничний хліб у годівницях, вода надається необмежено у сосудах з марлевими ґнотами.

Для оцінки дії принади з отрутою з культурального сосуду відловлюють по 30 особин тарганів (10 ♀, 10 ♂ та 10 л останнього віку) або 100 робочих особин мурашок і висипають їх в експериментальні ємності для досліджень, після акліматизації туди вносять засіб, який вивчають. Загиблих комах

підраховують щодня. Паралельно проводять контрольний варіант, аналогічний дослідному, але без отруйної принади. Повторність дослідів триразова.

Оцінку інсектицидної активності принад здійснюють за часом та відсотком смертності комах до їх повної загибелі. Загиблими вважають особин, які впродовж кількох хвилин не можуть пересуватися, а лише посмикують вусиками та кінцівками.

Для визначення залишкової дії проводять підсадку нової експериментальної групи комах через 7, 14, 21, 28 і більше діб. Випробування принад у вигляді гелей проводять двома способами :

нанесенням гелю у вигляді пунктирної лінії по периметру ємності (1,5 см гелю з інтервалом у 4 см) ;

розміщення гелю масою 0,5 – 1,5 г на підложку у ємність.

Метод оцінки ефективності харчових принад проти тарганів на основі аналогів ювенільного гормону (АЮГ) або інгібіторів синтезу хітину (ICX)

Існує безліч молекул, які контролюють членістоногих, запобігаючи успішному завершенню життєвого циклу комах, в той же час не проявляючи гостру токсичну дію для комах. Приклади таких молекул включають інгібітори синтезу хітину (ICX) та аналоги ювенільного гормону (АЮГ). ICX діє, порушуючи відкладення хітину під час утворення личинок кутикули комах після линьки, тоді як АЮГ має на меті втручатися в контроль гормону метаморфозу та розмноження на основі гормонів. Ці два типи молекул часто називають регуляторами росту комах, щоб відрізнити їх від звичайних інсектицидних засобів з нейротоксичною дією.

Отже, молекули, що впливають на цикл розвитку комах, можуть бути ефективними, не призводячи до негайної загибелі комах, і тому дослідження ефективності повинні бути розроблені для вирішення найбільш підходящої стадії життєвого циклу комах, чутливої до молекули, що цікавить, а також для вимірювання будь-якої тривалий вплив (наприклад, на фертильність та плодючість самок або будь-який вплив на ембріональний розвиток на стадії яйцеклітини).

Оцінку специфічної активності харчових принад на основі АЮГ або ICX проводять у лабораторних умовах на тарганах *Bl. germanica* з інсектарної культури.

Експерименти проводять методом вільного гуртового годування з можливістю вибору альтернативної їжі у лабораторному приміщенні при температурі повітря $(21 \pm 2) ^\circ\text{C}$, відносній вологості 60 – 70 %.

Для проведення дослідів з активності засобу використовують пластикові ємності розміром 28 x 22 x 16 см з вертикальними стінками, які зверху з внутрішнього боку змащують сумішшю вазеліну з вазеліновою олією для запобігання втечі тарганів. Укриттям для комах слугує нижня частина темних пластикових пляшок (0,5 л) з отворами, які вирізають на бічних стінках для входу та виходу піддослідних особин. Альтернативна їжа – розмочений пшеничний хліб у годівницях, вода надається необмежено у скляночках з марлевими ґнотами.

Для вивчення дії принади на основі АЮГ або ІСХ з культурального ємності відловлюють по 30 особин тарганів (10 ♀, 10 ♂ та 10 І останнього віку) і висипають їх в експериментальні ємності для досліджень, після акліматизації туди вносять засіб, який досліджують.

Оцінку дії принади здійснюють, підраховуючи кількість личинок з морфологічними змінами. Особини з видимими порушеннями у розвитку з'являються не раніше, ніж за 5 – 7 діб.

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних засобів у аерозольному або безпропелентному аерозольному упакованні (БАУ) проти повзаючих комах

Оцінку специфічної активності засобів у аерозольному або безпропелентному аерозольному упакованні проти повзаючих (нелітаючих) комах проводять на імаго рудих тарганів з лабораторної культури. Комах в експерименти відбирають з дотриманням методу випадкової вибірки. Для дослідів готують не менше 3 партій комах по 10 особин (5♂ і 5♀) у кожній.

Критерієм оцінки ефективності інсектицидного аерозольного засобу проти повзаючих комах є гостра та залишкова специфічна активність.

Дослідження проводять у незабрудненому інсектицидами приміщенні. Температуру повітря підтримують на рівні (22 ± 2) °С, відносну вологість 60 – 70 %.

Гостру інсектицидну дію засобу оцінюють при прямому (безпосередньому) зрошенні комах струменем аерозолі, тривалість залишкової дії визначають методом примусового контактування тарганів з обробленою засобом тест – поверхнею. Досліди становлять у камері об'ємом 2 м³, яка обладнана вентиляційною системою.

При прямому зрошенні для вивчення гострої дії у камері на площі 1 м² за постійною схемою розміщують скляні банки (0,5 л) з 10 комахами (5 самців і 5 самиць) та одночасно розкладають скляні (невсмоктуючі вологу) та пористі з дикту (всмоктуючі вологу) тест – поверхні розміром 15 x 15 см для подальшого

вивчення залишкової дії відкладень аерозолі. Для запобігання розбіганню тарганів банки з внутрішнього верхнього краю попередньо змащують сумішшю вазеліну з вазеліновою олією (1:1). Обробку аерозолем комах у банках і тест – поверхонь проводять з висоти 20 см під кутом 45° до дна камери при нормі витрати засобу $10 - 20 \text{ г/м}^2$ (у залежності від рецептури засобу). Дозування зрошення здійснюють за часом, попередньо розрахованим у дослідах. Контроль витрати засобу проводять за допомогою зважування балону до та після зрошення. За 10 хв. по зрошенні оброблених комах переносять у чистий посуд і продовжують спостереження за їх станом. Реєстрацію уражених тарганів проводять через певний проміжок часу (кожну хвилину, потім через 10, 30 та 60 хв.). Загибель комах визначають за 24 та 48 год.

Досліди по оцінці залишкової дії відкладень аерозолі проводять стандартним методом примусового контактування тарганів з тест – поверхнею.

Тест – поверхні (скляні та дерев'яні) прибирають з камери після обробки і просушування та зберігають у вертикальному положенні при кімнатній температурі. Для визначення терміну залишкової дії відкладень засобу на тест – поверхні періодично підсаджують тарганів (через 1, 7, 14 та 21 добу). Експозиція складає 15 хв. Загибель визначають через 24, 48 і 72 години в залежності від хімічної структури діючої речовини.

Дія інсектициду вважається закінченою, коли смертність комах складає менше 50 %. Досліди повторюють тричі.

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних засобів, які застосовують шляхом зрошення

Оцінку специфічної інсектицидної активності концентратів емульсій, мікро- та макроемульсій, порошків, що змочуються та порошків, що розчиняються, гелей призначених для боротьби з комахами шляхом зрошення, проводять у лабораторних умовах на рудих тарганах *Bl. germanica* з інсектарної культури.

Експерименти проводять у незабрудненому інсектицидами приміщенні при температурі $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, відносній вологості 60 – 70 %.

Зразок засобу інтенсивно струшують і беруть наважку для приготування серії концентрацій шляхом розведення водою.

Досліди проводять у камері об'ємом 2 м^3 , яка обладнана вентиляційною системою. На споді камери на площі 1 м^2 за стандартною і постійною схемою у п'яти точках рівномірно розміщують скляні банки (0,5 л) з 10 тарганами (співвідношення ♀: ♂ 1:1) та одночасно розкладають гладенькі скляні (не всмоктують вологу) та пористі з дикту (всмоктують вологу) тест – поверхні

розміром 15 x 15 см для подальшого вивчення залишкової дії відкладень засобу. Банки попередньо змащують по внутрішньому краю вазеліном і вазеліновою олією (1:1) для попередження розбігання тарганів. Комах та тест-поверхні зрошують засобом з пульверизатора або оприскувача типу “Росинка” чи “Квазар” з висоти 20 см під кутом 45° до споду камери при нормі витрати 50 мл/м². Витрату засобу визначають: 1) беручи попередньо 50 мл робочої рідини при обробці скла чи 100 мл при обробці дикту або 2) шляхом зважування оприскувача із засобом до та після застосування.

Тарганів і тест-поверхні прибирають з камери за 10 хв після зрошення. Комах переносять у чистий посуд і ведуть спостереження за їх станом. Реєстрацію уражених тарганів проводять через певний проміжок часу (10, 30 хв.) , потім кожну годину впродовж 5 год. і далі кожного дня протягом 3 діб, відмічаючи число комах без зовнішніх ознак ураження, паралізованих (у стані нокдаун) та загиблих. Досліди повторюють тричі.

Залишкову дію відкладень засобу визначають методом примусового контактування комах з обробленою поверхнею на 1, 7 добу і далі з інтервалом у 1-2 тижні до закінчення інсектицидної дії. Експозиція складає 15 хв. Комах після контактування з обробленими поверхнями переносять у чистий посуд і реєструють їх стан за 24 – 48 годин.

2.3 Визначення специфічної активності інсектицидних засобів для боротьби з літаючими комахами

Тест-об’єкти для досліджень

При дослідженні специфічної біологічної активності інсектицидних засобів стосовно літаючих комах (мух, комарів, ос, молі тощо), в якості модельних тест-об’єктів зазвичай використовують кровосисних комарів (*Aedes aegypti* L.) та хатніх мух (*Musca domestica* L.). Експерименти проводять з імаго й личинками комарів і мух.

У разі надання заявки на отримання дозволу на продукт із декларацією щодо "знищення комах, що літають" перевагу слід надати комарам, мухам та осам. Випробування на мухах, як правило, слід проводити, починаючи з домашньої мухи, *Musca domestica*. Випробування на комарах, як правило, слід проводити на *Culex* spp., *Aedes* spp. Тест на осах зазвичай слід проводити з *Vespula* spp.

Мухи

Мухи завдають дискомфорту у всіх місцях проживання та життєдіяльності людини.. Мухи також є переносниками збудників інфекційних

хвороб людини, включаючи збудників сальмонельозів, дизентерії та кишкову паличку, збудників поліомієліту та яйця гельмінтів. При бактеріологічному дослідженні на окремих особинах виявлено від 550 тисяч до 6 млн. бактерій. Можлива сфера використання інсектицидних засобів проти мух включає житлові, громадські приміщення, лікарні, комори, кухні, сміттєзвалища, приміщення для тварин тощо.

Найбільш поширеною є домашня муха (*Musca domestica*), цикл розвитку якої включає 4 стадії: яйце, личинка, лялечка, імаго. Тривалість життя в середньому складає 30-35 днів. Через 4-8 днів після копуляції мухи відкладають яйця. Місцями для кладки яєць є різноманітні відходи органічного походження. Через 8-25 годин після кладки з яєць вилуплюються личинки. Тривалість личиночної стадії залежить від умов навколишнього середовища і в середньому складає від 5 до 26 днів. Стадія лялечки у сприятливих умовах триває від 3 до 18 днів. У середньому цикл розвитку мухи у залежності від пори року триває від 14 до 24 днів. Завдяки швидкості розмноження протягом літа мухи дають багато чисельне потомство.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти мух

Інсектицидний засіб може бути дозволений лише у тому випадку, коли він має достатній рівень ефективності. Інсектицид проти мух вважається досить ефективним, якщо можна досягти наступних результатів:

Засоби, призначені для використання при загальній обробці поверхні, при використанні аерозолей та ефектрофумігаторів в середині приміщень (будинків):

необхідно мати результати при дослідженні в модельному експерименті:

рівень ефективності збивання комах повинен бути $\geq 80\%$;

летальність через 24 години повинна бути $> 90\%$.

Засоби, призначені для використання при обробці поверхні, у вигляді спрею або ефектрофумігатора на закритих смітниках та сміттєзвалищах:

необхідно мати результати при дослідженні в лабораторних умовах:

рівень ефективності збивання комах повинен бути $\geq 80\%$;

летальність через 24 години повинна становити $\geq 90\%$;

Засоби, призначені для використання на личинках:

необхідно мати результати при дослідженні в лабораторних умовах:

летальність личинок $> 90\%$ (показник зменшення кількості нових мух).

Відхилення від цих норм можливі, але повинні бути обґрунтовані.

Комарі

Комарі, в тому числі види *Culex*, *Aedes* і *Anopheles*, поширені в Україні. Окрім укусів та своєї дратівливої поведінки, комарі добре відомі, як переносники збудників таких небезпечних хвороб, як малярія (*Anopheles* spp.), Жовта лихоманка, гарячка Денге (*Aedes* spp.), гарячка Західного Нілу (*Culex* spp.) тощо. Окремі види комарів можуть бути механічними переносниками збудників туляремії.

Самки комарів харчуються рослинними соками та кров'ю людини. Напившись крові, самка ховається у темне місце до кінця визрівання яєць, після кладки яєць, як правило на поверхню водойм, самка знову п'є кров. Тривалість розвитку яєць залежить від умов навколишнього середовища. Личинки комара під час свого розвитку проходять у воді чотири стадії, що розділяються линьками. Після останньої личинка перетворюється на лялечку. Після визрівання лялечки шкірка на її спинці лопається і з неї виходить комар. Тривалість розвитку водних фаз комара складає близько 2-4 тижнів.

Дослідження інсектицидних засобів слід проводити з домашнім комаром (*Culex* spp.), дослідження репеленти слід проводити на комарах виду *Aedes* spp.

Норми та критерії оцінки ефективності інсектицидних засобів проти комарів

Інсектицидний засіб може бути дозволений лише у тому випадку, якщо він має достатній рівень ефективності. Інсектицид проти комарів вважається досить ефективним, якщо можна досягти наступних результатів:

Засоби, що призначені для використання при загальній обробці поверхні, при використанні аерозолей та електрофумігаторів в середені приміщень (будинків):

необхідно мати результати при дослідженні в модельному експерименті:

рівень ефективності збивання повинен бути > 80%;

летальність через 24 години повинна бути > 90%.

При дослідженні репелентів:

необхідно мати результати при дослідженні на лабораторних тестах:

Впродовж заявленого періоду захист повинен становити ~ 100% (тобто період до другого укусу або перший підтверджений укус є заявленим періодом);

Продукти, призначені для використання як репеленти (не на шкірі чи одягу):

лабораторний та/або модельований тест на використання, що демонструє відштовхуваність;

залежно від тестового випробування, що показує відштовхуваність (наприклад, ~ 80% для репелентів, які видаються для захисту зовнішнього простору (намети).

Відхилення від цих норм можливі, але повинні бути обґрунтовані.

Методи оцінки специфічної активності інсектицидних засобів для боротьби з літаючими комахами

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних принад для боротьби з мухами

Інсектицидні отруєні принади для боротьби з мухами виробляють у вигляді гранул, сухого цукрового порошку, рідини.

Оцінку специфічної активності принад проводять на хатніх мухах *M. domestica* з лабораторної популяції. Комах в експеримент відбирають з дотриманням методу випадкової вибірки.

Досліди проводять у приміщенні, незабрудненому інсектицидами. Температура повітря в приміщенні $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, відносна вологість 60-70 %.

Для експериментів використовують спеціальні камери (бокси) розміром 100x100x100 см. У центрі камери розміщують ємність з рідкою принадою або на підкладенку насипають 2-3 г сухої форми принади. Цукрову принаду розчиняють у воді, наносять на скляну, з дикту або з іншого матеріалу поверхню, дають підсохнути, потім розміщують у центрі камери.

У дослідах використовують метод вільного контактування комах з принадою. Мух відловлюють з культуральної популяції і по (100 ± 5) особин випускають в експериментальні камери.

Паралельно становлять контрольний варіант з альтернативним кормом (5 % -вий розчин цукру) замість принади.

Реєстрацію загибелі та стану мух проводять за 1, 2, 4, 24 години.

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних засобів у вигляді електрофумігаторів

Оцінку специфічної активності електрофумігаторів з інсектицидними пластинами або рідиною для боротьби з літаючими комахами проводять на імаго кровосисних комарів *An.m.atroparvus* та *Ae.aegypti* з лабораторних культур. Для випробувань використовують молодих комарів (5-10 діб) без визначення статі, а також активних самиць, які знаходяться між гонотрофічними циклами.

Електрофумігатори з пластинами

Визначення специфічної активності засобу проводять у спеціальних камерах розміром 100x100x100 см з підсвічуванням, які не забруднені інсектицидами. Температура повітря в приміщенні повинна підтримуватись на рівні (23 ± 2) °C, відносна вологість не більше (65 ± 5) %. У чисту камеру запускають комарів. На одну повторність беруть (100 ± 5) особин. Електрофумігатор підключають до електричної мережі за 15 хв до початку досліду. Інсектицидну пластину дістають з розкритого плівочного упакування, вставляють її під захисні ґрати прогрітого електрофумігатора, вмикають його в розетку (220 В) таким чином, щоб пластина була в горизонтальному положенні, зразу розміщують прилад з пластиною в центрі камери і починають проводити спостереження стану та реєстрацію кожну хвилину за допомогою секундоміру нокдауну комах.

Оцінку специфічної дії засобу здійснюють за середнім часом настання нокдауну в 50 % особин (KT_{50}), у 99 % комах (KT_{99}). Значення KT_{50} (хв) визначають з графіку залежності НД комарів від часу дії працюючого електрофумігатора з пластиною. Дослід повторюють тричі. Камеру між випробуваннями протирають етиловим спиртом і провітрюють не менше однієї години.

Для визначення загибелі комарів після 30 хв., 1 год. і 2 год. дії засобу комах з камери переносять у чисті марлеві садки з ватними тампонами, просоченими сиропом з цукру, і за 24 год. перевіряють їх стан. Для всіх випробувань проводять контрольні дослід.

Електрофумігатори з рідиною

Для обробки камери об'ємом 1 м³, в якій проводяться випробування зі 100 ± 5 комарами, прогрівають протягом 60 хв. електрофумігатор, вставляють в корпус прогрітого фумігатора флакон з інсектицидною рідиною, щільно вкручують. Повертають вилку фумігатора таким чином, щоб після його підключення в розетку (220 В) флакон був у вертикальному положенні, вносять підключений прилад з флаконом в камеру, розміщують його в центрі камери та починають проводити спостереження за станом комарів. За допомогою секундоміру кожну хвилину реєструють нокдаун комарів.

Оцінку специфічної дії засобу здійснюють за середнім часом настання нокдауну в 50 % особин (KT_{50}), у 99 % комах (KT_{99}). Значення KT_{50} (хв.) визначають з графіку залежності НД комарів від часу дії працюючого електрофумігатора з рідиною. Дослід повторюють тричі. Камеру між випробуваннями протирають етиловим спиртом і провітрюють не менше однієї години.

Для визначення загибелі комарів після 30 хв., 1 год. і 2 год. дії засобу комах з камери переносять у чисті марлеві садки з ватними тампонами, просоченими сиропом з цукру, і за 24 год. перевіряють їх стан. Для всіх випробувань проводять контрольні дослід.

Метод оцінки специфічної активності засобів у аерозольному упакованні проти літаючих комах

Оцінку специфічної активності засобів в аерозольному упакованні проти літаючих комах проводять на імаго хатніх мух або кровосисних комарів *Ae.aegypti* з лабораторних культур без визначення статі. Комах в експерименті відбирають з дотриманням методу випадкової вибірки. Для дослідів готують не менше 5 партій комах по 100 осіб у кожній.

Експерименти проходять у незабрудненому інсектицидами приміщенні. Температуру повітря підтримують на рівні (22 ± 2) °C, відносну вологість 60-70 %.

Досліди становлять у камері об'ємом 1 м^3 , яка обладнана підсвічуванням. На одну повторність експерименту використовують (100 ± 5) комах. Струмін аерозолі з попередньо струшеного балону спрямовують у камеру. Норм витрати не більше 1 г/м^3 . Контроль за витратою засобу здійснюється за допомогою зважування аерозольного балону до та після впорскування.

Гостру інсектицидну активність аерозольного засобу оцінюють за величиною показників C_{15} , Q_{15} , та KT_{50} (середній час, впродовж якого ушкоджено 50 % піддослідних комах). Показники C_{15} та Q_{15} , - це умовно прийняті величини. C_{15} (мг/м^3) – величина концентрації інсектициду в повітрі, яка викликає ураження 99 % мух або комарів впродовж умовно прийнятого часу – 15 хв., Q_{15} (мг/м^3) - кількість суміші, яка вийшла з балону і викликає ушкодження 99 % комах за 15 хв.

$$C_{15} = C \cdot T / 15 ; Q_{15} = C_{15} \cdot 100 / \text{мас ДР}$$

Величину KT_{50} вираховують графічно за допомогою пробіт-аналізу.

Метод оцінки специфічної інсектицидної активності піротехнічних засобів проти літаючих комах

Оцінку специфічної інсектицидної активності піротехнічних засобів (таблетки, шашки, шнури тощо) проводять в лабораторних умовах на хатніх мухах або комарах з лабораторної культури.

Визначенню підлягають наступні параметри :

гостра дія засобу на комах;
залишкова дія засобу на комах.

Гостру дію інсектицидного піротехнічного засобу підраховують за загибеллю комах у камері об'ємом 2 м^3 через дві години після підпалення засобу.

Перед початком експерименту на споді камери розкладають 5 стандартних тест – поверхонь зі скла та дикту, потім запускають до неї 300 ± 10 піддослідних комах.

Залишкову дію засобу визначають шляхом підсадки на оброблені за дві години перед тим (далі за 1 і більше діб) тест – поверхні анестезованих хатніх мух або комарів. Експозиція – 5 хв. Облік загиблих проводять за 24 години.

Метод оцінки специфічної активності інсектицидних засобів (спіралей, стіків, свічок) для боротьби з літаючими комахами на відкритому просторі або у напівзакритих приміщеннях

Оцінку специфічної інсектицидної активності інсектицидних спіралей проводять в лабораторних умовах на імаго комарів рода *Anopheles* та *Ae. aegypti* з інсектарних культур.

Визначенню підлягають наступні параметри:

гостра дія засобу стосовно кровосисних комарів за величиною KT_{50} (середній час настання нокдауну у 50 % особин, хв);

гостра дія засобу стосовно кровосисних комарів за величиною KT_{99} (середній час настання нокдауну у 99 % особин, хв.);

Дослідження проводять методом вільного випуску комах у камери об'ємом 1 м^3 з підсвіткою. У камеру випускають за допомогою ексгаустера по (100 ± 5) імаго комарів без визначення статі, вносять підпалену та загашену інсектицидну спіраль. Кожну хвилину за допомогою секундоміра проводять реєстрацію комах у стані нокдаун. Значення KT_{50} та KT_{99} визначають з графіка залежності кількості паралізованих особин (%) від часу тління спіралі (хв.).

Метод оцінки ефективності липких пасток для боротьби з літаючими комахами (мухи)

Оцінку ефективності липких пасток у вигляді стрічок, аркушів, паличок проти літаючих комах проводять у лабораторних умовах на хатніх мухах *M.domestica* з лабораторної або природної популяції.

Визначенню підлягають наступні параметри:

кількість прилиплих мух, (%);

ресурс пастки (кількість мух/см²).

Досліди проводять у спеціальних прозорих камерах об'ємом 1,0 м³ методом вільного контактування мух з липкою пасткою. Липкі стрічки визволяють від гільзи і підвішують в камері. У камеру вносять корм і випускають (100±5) комах (50 самиць і 50 самців). Повторність досліду триразова. Кількість мух, що прилипла до стрічки, підраховують на другу добу.

2.4. Універсальний метод оцінки специфічної активності інсектицидних засобів у вигляді порошків проти повззаючих та літаючих комах

Оцінку специфічної активності інсектицидних засобів у вигляді порошків проводять в лабораторних умовах на рудих тарганах *Bl. germanica* і хатніх мухах *M. domestica* з інсектарної культури.

Експерименти проходять у незабрудненому інсектицидами приміщенні за температури повітря (22 ±2) °С, відносній вологості 60 –70 %.

Наважку порошку, відповідну рекомендованій нормі витрати засобу, із розрахунку не на 1 м², а на площу тест-поверхні наносять на пластини з дикту розміром 15х15 см і рівномірно розподіляють по ній. Комах підсаджують на оброблену поверхню на 30 с, потім переносять у чистий посуд. Загибель підраховують за 24 та 48 год.

Для визначення залишкової дії засобу комах підсаджують на тест - поверхню через 1, 3 і більше діб після обробки до закінчення інсектицидної дії. Підрахунок загибелі проводять за 24 та 48 год. після контактування.

Крім вищенаведених методів досліджень можуть бути використані і інші методи.

3. Визначення специфічної активності родентицидних засобів

3.1. Загальні положення

Цей розділ надає вказівки щодо методології оцінки ефективності родентицидних препаратів.

Слід зазначити, що будь-які випробування ефективності, проведені на гризунах, мають відповідати принципам, встановленим Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 27 стаття 230 (2006 р.) зі змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI (№ 1759-17) від 15.12.2009 р. про захист тварин, що використовуються в наукових цілях. Для всіх типів родентицидів ефективність має бути доведена в лабораторному досліді та у практичних випробуваннях. У лабораторних випробуваннях кількість тварин у кожному досліді має бути обмежена до мінімуму. Щодо лабораторних випробувань мета буде досягнута шляхом відмови від даних, якщо вже були

випробування з цілком порівнюваною принадою, що містить діючу речовину зі схожою або меншою токсичністю.

Оцінку специфічної активності хімічних родентицидних засобів (гострої або кумулятивної дії) у вигляді концентратів для виготовлення отруйних харчових принад і готових принад у різних препаративних формах на їх основі проводять на лабораторних лініях (дикі форми) сірих щурів (*Rattus norvegicus*), хатніх мишей (*Mus musculus*) або інших цільових видів.

Наразі існує багато стандартних методів випробувань, які можуть бути придатними для оцінки ефективності зооцидів. Перелік таких стандартів випробувань представлений у додатках 36-38. На додаток до стандартних методів випробувань, представлених у додатку 36, зразки протоколів для вибору тесту та практичних випробувань представлені у додатках 37 та 38 відповідно. Ці додатки призначені лише для надання додаткової інформації щодо видів досліджень, які можуть бути використані для оцінки ефективності деяких родентицидів, а також деяких факторів, які слід враховувати.

Під час оцінки слід враховувати будь-які відомі обмеження ефективності (включаючи стійкість). Можливі обмеження, заходи щодо зменшення ризику або рекомендації щодо використання продукту в конкретних екологічних чи інших умовах. Необхідно враховувати такі фактори, як, наприклад, жарке, холодне чи вологе середовище тощо, що можуть суттєво знизити ефективність родентицидних засобів при їх застосуванні зовні. Крім того, треба передбачати можливість розвитку резистентності до дії родентицидних засобів при постійному використанні засобу на основі однієї діючої речовини, виникнення та розповсюдження стійких штамів. Родентицидні засоби не дозволяється змішувати з іншими біоцидними продуктами. Результати дослідження із специфічної активності безпосередньо порівнюються з існуючими нормами та критеріями ефективності.

При проведенні всіх експериментів становлять контрольний варіант для оцінки стану та якості біоматеріалу.

Залежно від призначення, родентицидні засоби використовуються переважно для боротьби з домашньою мишею (*Mus musculus*) та пацюками *Rattus norvegicus* / *Rattus rattus*.

Сфери їх використання :

- в будівлях житлового та іншого призначення і навколо них;
- в приміщеннях і навколо них, призначених для приготування, переробки та зберігання продуктів харчування та напоїв;
- в магазинах і навколо них, корабельних трюмах, фабриках і силосних шахтах;

на сміттєзвалищах;
 у каналізації;
 у вологих середовищах, таких як водойми;
 відкриті зони, такі як аеропорти та зони дозвілля;
 на тваринницьких фермах (свиней, птиці, великої рогатої худоби тощо).

3.2 Тест-об'єкти

При використанні за призначенням, дослідження з специфічної активності проводяться :

для використання проти домашніх мишей - на *Mus musculus*.

для використання проти щурів - на *Rattus norvegicus* і *Rattus*.

для використання проти коричневих щурів - на *Rattus norvegicus*.

для використання проти щурів та домашніх мишей- на *Rattus norvegicus*, *Rattus* та *Mus musculus*.

для використання проти щурів в каналізації - на *Rattus norvegicus* зі спеціально обробленою приманкою

для використання проти гризунів

для цього знадобиться тестування принаймні на двох видах гризунів, які відрізняються між собою за розмірами та поведінкою, наприклад, водяні гризуни (*Arvicola amphibius*), берегові гризуни (*Myodes glareolus*) та звичайні гризуни *Microtus arvalis*.

для використання проти польових мишей (деревних мишей)- на зазначених цільових видах, наприклад, довгохвостій польовій миші / деревній миші (*Apodemus sylvaticus*) або польовій миші (*Apodemus flavicollis*).

В кожному випадку, тестування повинно бути специфічним для виду, і для кожного цільового організму слід проводити окреме дослідження. Це робиться тому, що біологія, поведінка та сприйнятливість цільових видів, навіть у таксономічних групах, таких як щури або миші, можуть значно відрізнятися. Наприклад, бурий щур (*R. norvegicus*) є більш чутливим до антикоагулянтів, ніж щур, що мешкає на даху (*R. rattus*).. Миші є таксономічно неспецифічними і можуть застосовуватися до широкого кола видів (наприклад, *Mus musculus* або різних видів *Apodemus*) з різною біологією, поведінкою та сприйнятливістю до діючих речовин. Полеві види значно відрізняються між собою за розмірами та місцем проживання. Тому всі цільові організми, повинні бути протестовані.

3.3 Норми та критерії оцінки ефективності родентицидних засобів

Родентицидний засіб може бути дозволений до застосування за умови достатньої ефективності. Вони вважають достатньо ефективними при наступних умовах:

при лабораторному дослідженні:

>90 % смертності у відповідні часові рамки

в умовах практичних випробувань:

моніторинг контрольованої популяції має показувати зниження її чисельності на 90 %.

при виборі приманки:

> 90 % смертності.

При цьому, відсоток спожитої принади, що містить родентицид, має бути 20 %, але він може бути нижчим, оскільки за рівня смертності < 90 % засіб все ще буде ефективним. У разі споживання < 20% принади необхідно надати обґрунтування.

Ефективність родентицидного засобу (принади) після кінцевого терміну зберігання також враховується при оцінці її ефективності. Відхилення від норм можливі, але мають бути обґрунтовані.

З метою сприяння розробці нових видів родентицидних засобів (менш токсичних, більш гуманних) смертність < 90 % може бути прийнятною, коли продукт використовується як супровідний метод (тобто використовується з іншим продуктом для демонстрації ефективності), але не як окремий продукт. Однак, летальність після використання цих нових засобів не повинна бути < 50 %.

3.4 Методика оцінки специфічної активності родентицидних засобів

Оцінку специфічної активності родентицидних засобів здійснюють при їх використанні як у вигляді нативних родентицидних препаратів (концентратів для приготування отруєних принад), так і готових родентицидних принад (зернових, гранульованих, тістоподібних принад, парафінованих брикетів). Дослідження проводяться на лабораторних лініях сірих щурів, хатніх мишей або інших цільових видах гризунів.

Досліди проводять у лабораторії в умовах поодинокого утримання гризунів у клітках за стандартних для експериментів температури (16 -23) °С, вологості (75 - 80) % та оптимальному режимі освітлення (природному або 12 : 12 год).

Питна вода надається без обмежень, годування – в залежності від умов дослідів. У якості контрольного корму використовують вівсяні крупи,

дослідного – готовий родентицидний засіб або принаду, виготовлену з родентицидного концентрату, який досліджується. Гризунів в експеримент беруть після тижневого карантину. Вагу тварин визначають на початку та наприкінці дослідів.

Протягом 7 – 5 діб гризунам пропонують контрольний корм (5 г вівсяної крупи для миші та 30 г для щура) в двох однакових годівницях, щоденно змінюючи їх місцями та реєструючи кількість з'їденого корму. Після цього корм в одній з годівниць замінюють на точно відмірену таку ж кількість отруєної принади та продовжують експеримент за можливості вибору альтернативного корму або прибирають корм і натомість вносять родентицидний засіб у вигляді принади. Кожного дня недоїдені рештки зважують та визначають кількість принади та контрольного корму, який з'їли тварини. Натомість кожного дня вносять нові порції дослідного та контрольного корму або тільки дослідного при безальтернативному годуванні. Час спостережень (5 –14 діб) – у залежності від класу діючої речовини родентицидного засобу або до загибелі гризунів. Протягом усього експерименту проводять спостереження за тваринами з метою реєстрації клінічних симптомів інтоксикації.

Визначенню підлягають наступні параметри:

доза ДР (мг), яку отримують гризуни впродовж досліду;

доза ДР (мг/кг маси тіла), яку в середньому отримують щури та миші в дослідях;

загибель гризунів (частка загиблих від числа взятих у дослід (%);

час (доба), впродовж якого відбувається загибель гризунів;

кількість з'їденого дослідного та контрольного корму (г на одну тварину);

поїдання дослідної принади (%) - частка з'їденої родентицидної принади від кількості з'їденого (отруєного + неотруєного) корму; ступінь привабливості родентицидної принади.

Крім вищенаведеного методу досліджень з визначення специфічної активності родентицидних засобів можуть бути використані і інші методи.

VI. ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ОЦІНКИ БЕЗПЕЧНОСТІ ДЛЯ ЗДОРОВ'Я ЛЮДИНИ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ

1. Загальні положення

1.1 Ці Методи розроблено з урахуванням вимог Європейського Союзу, ВООЗ та Організації економічного співробітництва та розвитку (OECD). У цих методах уніфіковано критерії токсикологічної оцінки дезінфекційних засобів з метою дослідження їх безпечності для здоров'я людини (далі – безпечність).

1.2. При оцінці безпечності дезінфекційних засобів необхідно враховувати можливі негативні наслідки для всіх груп населення, а саме: професійних користувачів, непрофесійних користувачів та людей, які безпосередньо чи опосередковано піддаються експозиції через навколишнє середовище, населення. Особлива увага повинна приділятися вразливим групам населення (діти, вагітні, жінки, що годують, люди похилого віку тощо).

В цих методах терміни вживаються в наступних значеннях:

алергенність	здатність викликати алергію - специфічну імунну відповідь сенсibilізованого організму на повторну дію алергену;
виражена репродуктивна токсичність	здатність дезінфекційного засобу в експерименті на тваринах вибірково індукувати порушення репродуктивної функції на рівні доз, при оцінці ризику яких встановлена величина безпечного рівня не може бути гарантована в реальних умовах застосування. (Можлива безпорогова мутагенна дія на гермінативні клітини);
доведена канцерогенність для людини	в епідеміологічних дослідженнях доведено причинний зв'язок між дією фактору та виникненням раку у людини;
достатні докази канцерогенності для тварин	результати одержані на кількох видах, лініях тварин чи в кількох експериментах, особливо при використанні різних шляхів введення або кількох доз. При цьому встановлено незвично велику для цього виду тварин частоту індукованих пухлин або їх нетипову локалізацію, тип, термін появи;
ембріотоксичність	здатність дезінфекційного засобу чинити токсичну дію на розвиток зародку або плоду (внутрішньочеревне затримання росту та розвитку, загибель плоду на різних стадіях ембріогенезу, тощо);
імовірний канцероген для	неадекватні докази канцерогенності дезінфекційного засобу для людини разом з достатніми доказами

людини	канцерогенності його для тварин. Відсутні докази канцерогенності дезінфекційного засобу для людини, але є достатні докази канцерогенності його для тварин з механізмом канцерогенезу, який може бути реалізованим в організмі людини. Виявлено канцерогенні властивості дезінфекційного засобу у коротко- та середньострокових тестах;
канцерогенність	властивість дезінфекційного засобу при дії на організм ссавців індукувати розвиток пухлин;
канцерогенні властивості, встановлені у коротко- та середньострокових тестах	встановлено генотоксичний ефект у тварин <i>in vivo</i> , а також на клітинах людини <i>in vitro</i> . Підвищення частоти випадків передпухлинних станів встановлених в моделях по дослідженню промоторної активності хімічних речовин. Дослідження потребують продовження у хронічних експериментах;
канцерогенність дезінфекційного засобу не встановлена	в адекватних епідеміологічних дослідженнях відсутні докази канцерогенності дезінфекційного засобу для людини. При відсутності епідеміологічних досліджень не встановлено канцерогенності у тварин, а також не виявлено генотоксичного ефекту в дослідах на тваринах <i>in vivo</i> , а також на клітинах людини <i>in vitro</i> ;
канцероген для людини	доведено канцерогенність дезінфекційного засобу для людини. Є обмежені докази канцерогенності дезінфекційного засобу для людини і/або достатні докази канцерогенності його для тварин кількох видів при умові відсутності щодо принципових розбіжностей в механізмах канцерогенезу для людини і цих видів тварин.
коефіцієнт кумуляції	відношення середньої смертельної дози, що встановлена при багаторазовому введенні тваринам (5 разів на тиждень впродовж двох місяців на рівні 0,1 від середньої смертельної дози) до середньої смертельної при одноразовому введенні у шлунок;
коефіцієнт можливості інгаляційного отруєння	відношення концентрації дезінфекційного засобу, якої максимально вдається досягти в повітрі при 20°C град. до середньої смертельної концентрації засобу;
малоймовірний канцероген для людини	відсутні докази канцерогенності дезінфекційного засобу для людини. Наявні обмежені докази канцерогенності дезінфекційного засобу для тварин. Показана відсутність канцерогенних властивостей у коротко- та

	середньострокових тестах;
мутагенність	здатність спричиняти мутації;
мутація	спадкова зміна у кількості або послідовності основ дочірної ДНК, що приводить до порушення в передачі генетичної інформації;
неадекватні докази канцерогенності для людини	результати досліджень не можна інтерпретувати через методичні недоліки при їх виконанні (неадекватні математичні методи, малі вибірки, нестандартна морфологічна обробка);
небезпечність дезінфекційного засобу	ймовірність виникнення шкідливих для здоров'я і навколишнього середовища ефектів в реальних умовах виробництва або використання дезінфекційного засобу;
обмежені докази канцерогенності для людини	в епідеміологічних дослідженнях виявлено збільшення онкологічних захворювань людей, що контактують з даним дезінфекційним засобом, але не досить доказів для доведення причинного зв'язку (мала кількість спостережень, важко виключити вплив інших факторів і т.ін.);
обмежені докази канцерогенності для тварин	результати в експериментальних дослідженнях отримані на одному виді, одній лінії тварин, в одному експерименті; або індуковані пухлини часто зустрічаються спонтанно, їх важко класифікувати як злоякісні тільки за одними гістологічними критеріями (аденоми та аденокарциноми легенів, пухлини печінки у мишей деяких ліній): або низька частота виявлених пухлин;
помірний алерген	дезінфекційний засіб, що при внутрішньошкірному введенні у вуха морським свинкам в стандартній дозі 200 мкг або при 20-кратному нанесенні на шкіру спричинює сенсibilізацію більш як у 30% тварин. Вираженість шкірних тестів 2,0-3,0 бала за уніфікованою шкалою, вірогідність різниці середньогрупових показників найбільш чутливих тестів алергодіагностики - $P 0,05$. При інгаляційному надходженні в організм (30 діб, щоденна експозиція 4 години) поріг сенсibilізуючої дії не відрізняється вірогідно від порогу хронічної дії;
помірний подразник	дезінфекційний засіб, що при одноразовому нанесенні на шкіру і слизові оболонки очей лабораторних тварин в концентрованому виді і при повторній дії у вигляді робочого розчину чинить помірно виражене подразнення

поріг сенсibiliзуючої дії	шкіри (2,1-4,0 бала) і слизових оболонок. У людей наслідком контакту з дезінфекційним засобом є помірно виражене подразнення; мінімальна доза дезінфекційного засобу, що спричинює розвиток слабо виражених ознак сенсibiliзації у поодиноких тварин;
помірна репродуктивна токсичність	здатність дезінфекційного засобу в експерименті на тваринах вибірково індукувати порушення репродуктивної функції на рівні доз, при оцінці ризику яких встановлена величина безпечного рівня може бути гарантована в реальних умовах його застосування;
поріг хронічної дії	мінімальна доза дезінфекційного засобу, при дії якої в організмі (за конкретних умов введення сполуки та стандартної статистичної групи тварин) виникають зміни, що виходять за межі фізіологічно пристосовувальних реакцій, або прихована (тимчасово компенсована) патологія;
репродуктивна токсичність	здатність дезінфекційного засобу індукувати порушення функції розмноження;
репродуктивна токсичність відсутня	в експериментальних дослідженнях при дії максимального переносимих доз ефект не перевищує спонтанного рівня;
сильний алерген	дезінфекційний засіб, що при внутрішньошкірному введенні у вуха морським свинкам в стандартній дозі 200 мкг або при 20-кратному нанесенні на шкіру спричинює сенсibiliзацію більш як у 50% тварин. Вираженість шкірних тестів більше трьох балів за уніфікованою шкалою, вірогідність різниці середньогрупових показників найбільш чутливих тестів алергодіагностики - $P = 0,01$. При інгаляційному надходженні в організм (30 діб, щоденна експозиція 4 години) поріг сенсibiliзуючої дії мінімум втричі нижчий порогу хронічної дії;
сильний подразник	дезінфекційний засіб, що при одноразовому нанесенні на шкіру лабораторних тварин і слизову оболонку очей кроликів в концентрованому виді або у вигляді робочого розчину чинить різко виражену подразнюючу дію (4,1-6,0 бала при дії на шкіру, опіки слизових оболонок і рогівки ока. У людей наслідком контакту з концентрованим препаратом або повторної дії робочих розчинів є токсичні дерматити, виражене подразнення слизових оболонок

сильний тератоген	очей та дихальних шляхів; перевищення спонтанного рівня вад розвитку у лабораторних тварин при дії доз, які не спричиняють клінічних проявів інтоксикації у самок;
слабка репродуктивна токсичність	токсична дія пестициду на функцію розмноження не є вибірковою;
слабкий алерген	вираженість шкірних тестів менше 2,0 бала за уніфікованою шкалою, зміна імунологічних показників спостерігається у поодиноких тварин і виражена слабо. При інгаляційному надходженні в організм в стандартних умовах досліду поріг сенсibiliзуючої дії перевищує поріг хронічної дії щонайменше в 1.1-2 рази;
слабкий подразник	дезінфекційний засіб, що при одноразовому нанесенні на шкіру і слизові оболонки очей лабораторних тварин в концентрованому вигляді чинить слабку подразнюючу дію на шкіру (0,1-2,0 бала) та слизові оболонки очей. При повторній дії робочого розчину подразнення не виникає. У людей, які контактують з дезінфекційний засіб, подразнення шкіри практично відсутнє;
слабкий тератоген	перевищення спонтанного рівня вад розвитку у лабораторних тварин при дії максимально переносних доз;
сенсibiliзація	імунологічний процес, який виникає в організмі після контакту з алергеном;
середня смертельна доза при введенні в шлунок, мг/кг	доза дезінфекційного засобу, що спричинює загибель 50% тварин при одноразовому введенні в шлунок (при спостереженні протягом двох тижнів);
середня смертельна доза при нанесенні на шкіру, мг/кг	доза дезінфекційного засобу, що спричинює загибель 50% тварин при одноразовому нанесенні на шкіру (при спостереженні протягом двох тижнів);
середня смертельна концентрація в повітрі, мг/м ³	концентрація дезінфекційного засобу, що спричинює загибель 50% тварин при інгаляційній дії в стандартних умовах при спостереженні протягом двох тижнів;
тератогенність	здатність дезінфекційного засобу спричиняти структурні вади розвитку у людини або лабораторних тварин;
токсичність	властивість дезінфекційного засобу при дії на організм в певній кількості порушувати нормальну його життєдіяльність.

2. Вимоги до проведення досліджень

2.1. Методологія токсикологічних досліджень дезінфекційних засобів полягає в урахуванні загальних принципів токсикології – пріоритетності медичних показників та порогу шкідливої дії.

Основні задачі токсикологічних досліджень дезінфекційних засобів:

отримання кількісних параметрів токсичності дезінфекційних засобів;
прогнозування реальної небезпечності дезінфекційних засобів для здоров'я людей, що мають з ними контакт при виробництві або використанні та населення.

2.2. Програма досліджень токсичності та небезпечності дезінфекційних засобів визначається з урахуванням:

складу засобу,
даних щодо хімічного складу діючої речовини з урахуванням домішок.
фізико-хімічних властивостей діючої речовини (ступінь чистоти, щільність, молекулярна маса, леткість, рН, температура кипіння або плавлення, стійкість, розчинність тощо);
даних по допоміжним компонентам засобу;
сфери застосування (призначення) засобу;
особливостей режимів використання (способу використання, робочих концентрацій, норм та кратності застосування)
виду оброблювальних об'єктів.

2.3 Всі випробування з визначення токсичності засобів, які проводяться на хребетних тваринах, повинні відповідати вимогам захисту лабораторних тварин у відповідності до норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 27 стаття 230 (2006 р.) зі змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI (№ 1759-17) від 15.12.2009 р.

3. Визначення токсичності та безпечності діючих речовин та препаративних форм дезінфекційних засобів

3.1. При вирішенні питання щодо обсягу токсикологічних досліджень з визначення безпечності дезінфекційного засобу першим етапом повинен бути аналіз наявних даних відкритих наукових джерел та матеріалів виробника щодо ступеню небезпечності діючої речовини засобу.

3.2. Токсикологічна характеристика ДР повинна включати відомості щодо параметрів токсикометрії при різних шляхах надходження до організму та оцінки загальних токсичних, специфічних та віддалених ефектів, а саме:

гострої токсичності при надходженні до організму тварин через шлунок;
гострої токсичності при надходженні до організму тварин через шкіру
гострої токсичності при надходженні до організму тварин через органи дихання;
клінічної картини інтоксикації;
подрозднюючої дії на шкіряні покрови;

подразнюючої дії на слизові оболонки очей;
 сенсibiliзуючих властивостей
 субхронічної токсичності;
 хронічної токсичності;
 мутагенної дії;
 канцерогенної дії;
 тератогенної дії,
 гонадотропної дії та впливу на репродуктивну функцію;
 дії на нервову, імунну, ендокринну системи;
 дослідження метаболізму та токсикокінетики;
 гігієнічного нормування в об'єктах навколишнього середовища(в повітрі
 робочої зони, атмосферному повітрі населених місць, воді водоймищ.

3.3. Дослідження з визначення токсичності ДР необхідно проводити з технічною ДР або з максимально хімічно чистою речовиною.

3.4. При оцінці дезінфекційних засобів необхідно аналізувати результати оцінки ДР разом з результатами загальної оцінки самого дезінфекційного засобу. Для дезінфекційного засобу, що містить більше ніж одну діючу речовину, будь-які несприятливі ефекти також повинні розглядатися разом для отримання загальної оцінки дезінфекційного засобу.

3.5. Токсикологічна характеристика препаративної форми дезінфекційних засобів, що в своєму складі крім ДР містять додаткові компоненти, повинна включати дані щодо:

гострої токсичності при надходженні до організму тварин через шлунок;
 гострої токсичності при надходженні до організму тварин через шкіру ;
 гострої токсичності при надходженні до організму тварин через органи дихання;
 клінічної картини інтоксикації;
 подразнюючої дії дезінфекційного засобу та його робочих розчинів на шкіряні покрови;
 подразнюючої дії дезінфекційного засобу та його робочих розчинів на слизові оболонки очей;
 сенсibiliзуючих властивостей.

3.6. При дослідженні дезінфекційних засобів різного призначення, поряд із дослідженнями на тваринах, можуть бути використані дослідження *in vitro*.

Тести *in vitro* при дослідженні гострої токсичності надають додаткову інформацію, яка може бути використана для визначення початкових доз для досліджень *in vivo*, сприяння оцінці даних досліджень на тваринах, особливо для виявлення видових відмінностей, або для підвищення розуміння токсикологічного механізму дії речовин. В той же час, вони не можуть бути використані для заміни випробувань на тваринах повністю.

Необхідно також уникати тестування *in vivo* з використанням агресивних речовин у концентраціях/дозах, що спричиняють роз'їдання шкіри та слизових оболонок ока.

3.7. Класифікація дезінфекційних засобів та їх діючих речовин за ступенем небезпечності наведена у Додатку 36.

4. Загальна характеристика методів досліджень з визначення токсичності та небезпечності діючих речовин та препаративних форм дезінфекційних засобів

4.1. Токсикологічні дослідження з визначення небезпечності ДР та їх препаративних форм є релевантними якщо вони проведені установами, акредитованими на право проведення відповідних робіт відповідно до вимог належної лабораторної практики або в установленому законодавством порядку.

При оцінці наукових джерел щодо токсичності та небезпечності дезінфекційних засобів та їх ДР надійними вважаються результати досліджень, проведені відповідно до вимог OECD/GLP.

У випадках, коли для однієї речовини доступно декілька результатів досліджень, слід вибрати найбільш релевантний; інші дослідження слід вважати допоміжними даними.

4.2. Оцінка токсичності ДР та препаративних форм дезінфекційних засобів базуються на дослідженнях (додаток 37).

4.3. Інформація про гостру токсичність при різних шляхах надходження не обмежується наявністю значень середньо смертельних доз та концентрацій. Важлива також додаткова інформація, наприклад, характер та вираженість клінічних ознак токсичності, місцеві подразнюючі ефекти, час настання та зворотність токсичних ефектів, токсичні ефекти в залежності від статі, відомості про конкретні уражені органи та тканини.

5. Вимоги до дезінфекційних засобів

5.1. Дезінфекційний засіб вважається таким, стосовно якого не може бути забезпечено здійснення ефективних заходів щодо запобігання шкідливому впливу засобу на здоров'я людини у разі, коли його препаративна форма відноситься до 1 класу небезпечності за параметрами гострої токсичності та сенсibiliзуючих властивостей, а також, ДР або один із компонентів:

- проявляє канцерогенні властивості (канцероген 1 або 2 класу);
- проявляє мутагенні властивості (мутаген 1 або 2 класу);
- відноситься до 1 або 2 класу за тератогенною активністю та впливом на репродуктивну функцію;
- має нейротоксичну дію під час розвитку організму або проявляє імунотоксичність.

**Генеральний директор Директорату
громадського здоров'я та
профілактики захворюваності**

Ірина РУДЕНКО

Додаток 1
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (пункт 2 розділу II)

ПЕРЕЛІК МОЖЛИВИХ ШТАМІВ ТЕСТ-МІКРООРГАНІЗМІВ

1. Бактерії (за виключенням мікобактерій і спороутворюючих бактерій)

1.1. *Enterobacter cloacae*

Колекції культур: CIP 104674, DSM 6234

1.2. *Enterococcus hirae*

Колекції культур: ATCC 10541, CIP 58.55, DSM 20160, NCIMB 8191

1.3. *Enterococcus faecium*

Колекції культур: ATCC 6057, DSM 2146

1.4. *Escherichia coli* (1)

Колекції культур: ATCC 10536, CIP 54.127, DSM 682, NCTC 10418,
NCIMB 8879

1.5. *Escherichia coli* (2) K12

Колекції культур: NCTC 10538, DSM 11250, CIP 54.117, NCIMB 10083,
IFO 3301, NCDO 1984, NBRC 3301

1.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Колекції культур: ATCC 15442, CIP 103467, DSM 939, NCIMB 10421

1.7. *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, Serotype *Typhimurium*

Колекції культур: ATCC 13311, CIP 5858, NCTC 74, DSM 5569
Salmonella typhimurium див. “*Salmonella enterica*”

1.8. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Колекції культур: ATCC 6538, CIP 4.83, DSM 799, NCTC 10788,
NCIMB 9518

2. Мікобактерії

2.1. *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

Колекції культур: ATCC 15769, DSM 44157, CIP 105415

2.2 *Mycobacterium terrae*

Колекції культур: ATCC 15755, DSM 43227, CIP 104321

3. Спороутворюючі бактерії

3.1. *Bacillus cereus*

Колекції культур: ATCC 12826, CIP 105151

3.2. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*

Колекції культур: ATCC 6633, DSM 347, NCTC 10400, CIP 5262

3.3. *Clostridium sporogenes*

Колекції культур: CIP 7939

4. Гриби (пліснява і дріжджеподібні гриби)

4.1. *Aspergillus niger* (пліснява)

Колекції культур: ATCC 16404, IP 1431.83, DSM 1988, CBS 733.88, NCTC 2275, CMI 149007, BCCM/MUCL 30113, BCCM/IHEM 3961

4.2. *Candida albicans* (дріжджеподібні гриби)

Колекції культур: ATCC 10231, IP 4872, DSM 1386, CBS 6431, NCTC 3179, BCCM/IHEM 3731

Додаток 2
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(пункт 3 розділу II)

НЕЙТРАЛІЗАТОРИ ТА ПРОМИВНІ РІДИНИ

1. Промивні рідини

Можна використовувати будь-яку з наступних промивних рідин:

вода (згідно з підпунктом 3.1.);
розчинник (згідно з підпунктом 3.1.);
водний розчин 0,1 % полісорбату-80;
водний розчин 0,5 % полісорбату-80;
водний розчин 0,5 % полісорбату-80 і 0,7 г / дм^3 лецитину;
нейтралізатор; спочатку перевірити чи час фільтрації не перевищує 1 хв;
буферні розчини

Цей перелік невичерпний і тому можуть використовуватися й інші промивні рідини.

2. Нейтралізатори

Можна використовувати будь-який з наступних нейтралізаторів:

лецитин 3 г / дм^3 ; полісорбат-80 30 г / дм^3 ; тіосульфат натрію 5 г / дм^3 ; L-гістидін 1 г / дм^3 ; сапонін 30 г / дм^3 в розчиннику або в фосфатному буфері 0,0025 моль / дм^3 ;

фосфатний буфер 0,25 моль / дм^3 :

калію дигідрофосфат (KH_2PO_4) 34 г

вода 500,0 см^3

довести рН до $7,2 \pm 0,2$ NaOH 1 моль / дм^3

вода до 1000,0 см^3

стерилізувати в автоклаві;

свіжий яєчний жовток, розбавлений до 5,0 % (об) або 0,5 % (об);
30 г / дм^3 полісорбату-80; 4 г / дм^3 натрію лаурилсульфату; лецитин 3 г / дм^3 ;
5 % (об) свіжий яєчний жовток; 40 г / дм^3 полісорбату-80;
7 % (об) окису етилену конденсату жирних спиртів; 20 г / дм^3 лецитину;
4 % (об) полісорбату-80;
4 % (об) окису етилену конденсату жирних спиртів; 4 г / дм^3 лецитину;
30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин 3 г / дм^3 ; L-гістидін 1 г / дм^3 ;
гліцин в концентрації засобу;
30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин 3 г / дм^3 ;
фосфоліпідна емульсія (комерційна) в концентрації 50 мг / см^3 (розбавлена 1 до 10);

натрію тіогліколят $0,5 \text{ г / дм}^3$ або 5 г / дм^3 ;

L-цистеїн $0,8 \text{ г / дм}^3$ або $1,5 \text{ г / дм}^3$;

тіояблучна кислота $0,075 \%$ (V/V) (доведена NaOH до pH 7);

натрію тіосульфат 5 г / дм^3 ;

каталаза або пероксидаза: одна одиниця цих ферментів каталізує розпад

1 μмоль перекису водню за хвилину при $(25,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ і pH 7;

полісорбат-80 30 г / дм^3 ; сапонін 30 г / дм^3 ; L-гістидін 1 г / дм^3 ; L-цистеїн 1 г / дм^3 .

Цей перелік невичерпний і тому можуть використовуватися й інші нейтралізатори.

3. Нейтралізатор, доданий до агару для підрахунку:

$10,0 \%$ (V/V) розчину, який містить $0,7 \text{ г / дм}^3$ лецитину і $5,0 \%$ (V/V)

полісорбату-80;

$10,0 \%$ (V/V) розчину, який містить 10 г / дм^3 лецитину і $5,0 \%$ (V/V) полісорбату-80;

$10,0 \%$ (V/V) розчину, який містить свіжий яєчний жовток $1,5 \%$ (V/V) і $5,0 \%$ (V/V) полісорбату-80.

4. Нейтралізатор, доданий до ТСБ:

30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин $0,3 \text{ г / дм}^3$; L-гістидін $0,1 \text{ г / дм}^3$, ТСБ 30 г/дм^3 ;

30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин $3,0 \text{ г / дм}^3$; L-гістидін $1,0 \text{ г / дм}^3$, тіосульфат натрію 5 г / дм^3 , ТСБ 30 г / дм^3 ;

30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин $3,0 \text{ г / дм}^3$; L-цистеїн $1,0 \text{ г / дм}^3$, ТСБ 30 г/дм^3 ;

30 г / дм^3 полісорбату-80; лецитин $3,0 \text{ г / дм}^3$; L-цистеїн $1,0 \text{ г / дм}^3$, тіосульфат натрію 5 г/дм^3 , ТСБ 30 г / дм^3 ;

бета-циклодекстрин $10 \text{ см}^3/\text{дм}^3$, ТСБ 30 г / дм^3 .

5. Нейтралізатори, які можна додавати до рідин для відбору проб або їх розчинників (ТСБ) для оцінки рівня після обробки:

Групи активних речовин	Нейтралізатор (концентрація в $1,0 \text{ дм}^3$ рідини для відбору проб)
Спирти	Полісорбат-80 $30,0 \text{ см}^3$; сапонін $30,0 \text{ г}$; лецитин $3,0 \text{ г}$. Для нейтралізації коротколанцюгових спиртів (менше C_5) можна використовувати метод розбавлення. При цьому треба звертати увагу, коли до складу антисептичного засобу окрім спиртів входять інші антимікробні компоненти.

Продовження додатку 2

Хлоргексидину глюконат	Полісорбату-80 30,0 см ³ ; лецитин 3,0 г; L-гістидін 1,0 г (вища концентрація до 5 раз може бути необхідна для повної нейтралізації)
Повідон-йод і хлорні сполуки	Лецитин 3,0 г; полісорбат-80 30,0 см ³ ; тіосульфат натрію 5,0 г; L-гістидін 1,0 г; бичачий альбумін ліофілізований 1,0 г
Фенольні сполуки	Лецитин 3,0 г; полісорбат-80 30,0 см ³ ; тіосульфат натрію 5,0 г; L-гістидін 1,0 г;
ЧАСи, жирні аміни	Полісорбат-80 30,0 см ³ ; сапонін 30,0 г ; лецитин 3,0 г
Амфотерні складові	Полісорбат-80 30,0 см ³ ; додецилсульфат натрію 4,0 г; лецитин 3,0 г; окису етилену конденсату жирних спиртів 3,0 г; лецитин 20,0 г; полісорбат-80 50 см ³ .
Бігуанідини або подібні складові	Полісорбат-80 30,0 см ³ ; сапонін 30,0 г; лецитин 3,0 г
Окислювачі (хлор, йод, перекис водню, надоцтова кислота, гіпохлорити тощо)	Тіосульфат натрію 3,0 – 20,0 г; полісорбат-80 30,0 см ³ ; лецитин 3,0 г; для перекису водню – полісорбат-80 50,0 см ³ ; каталаза 0,25 г; лецитин 10,0 г.
Альдегіди	Полісорбат-80 30,0 см ³ ; лецитин 3,0 г; L-гістидін 1,0 г (або гліцин 1,0 г). Полісорбат-80 30,0 см ³ ; сапонін 30,0 г; L-гістидін 1,0 г (або гліцин 1,0 г).

Зважаючи на рН дослідного антисептичного засобу відповідний рівень рН нейтралізатора можна отримати, готуючи його на фосфатному буфері 0,0025 моль / дм³ (згідно з пунктом 2 цього додатку).

6. Нейтралізатори, які можуть бути ефективними при проведенні спороцидного дослідів

6.1. Для альдегідів:

полісорбат-80 30,0 г / дм³; сапонін 30,0 г / дм³; гістидін 20,0 г / дм³; лецитин 3,0 г / дм³; гістидін 10,0 г / дм³; стерильна інактивована кінська сироватка 100,0 см³/дм³; гістидін 20,0 г / дм³.

6.2. Для окислювачів:

натрію тіогліколят 5,0 г / дм³, полісорбат-80 30,0 г / дм³, сапонін 30,0 г / дм³, лецитин 3,0 г / дм³;

цистеїн 1,5 г / дм³, тіосульфат натрію 3,0 г / дм³, полісорбат-80 30,0 г / дм³; сапонін 30,0 г / дм³; лецитин 3,0 г / дм³;

каталаза або пероксидаза: одна одиниця цих ферментів каталізує розпад 1,4 моль перекису водню за 1 хв при (25,0 ± 1,0) °С і рН 7;

тіосульфат натрію 5,0 г / дм³ або 10,0 г / дм³.

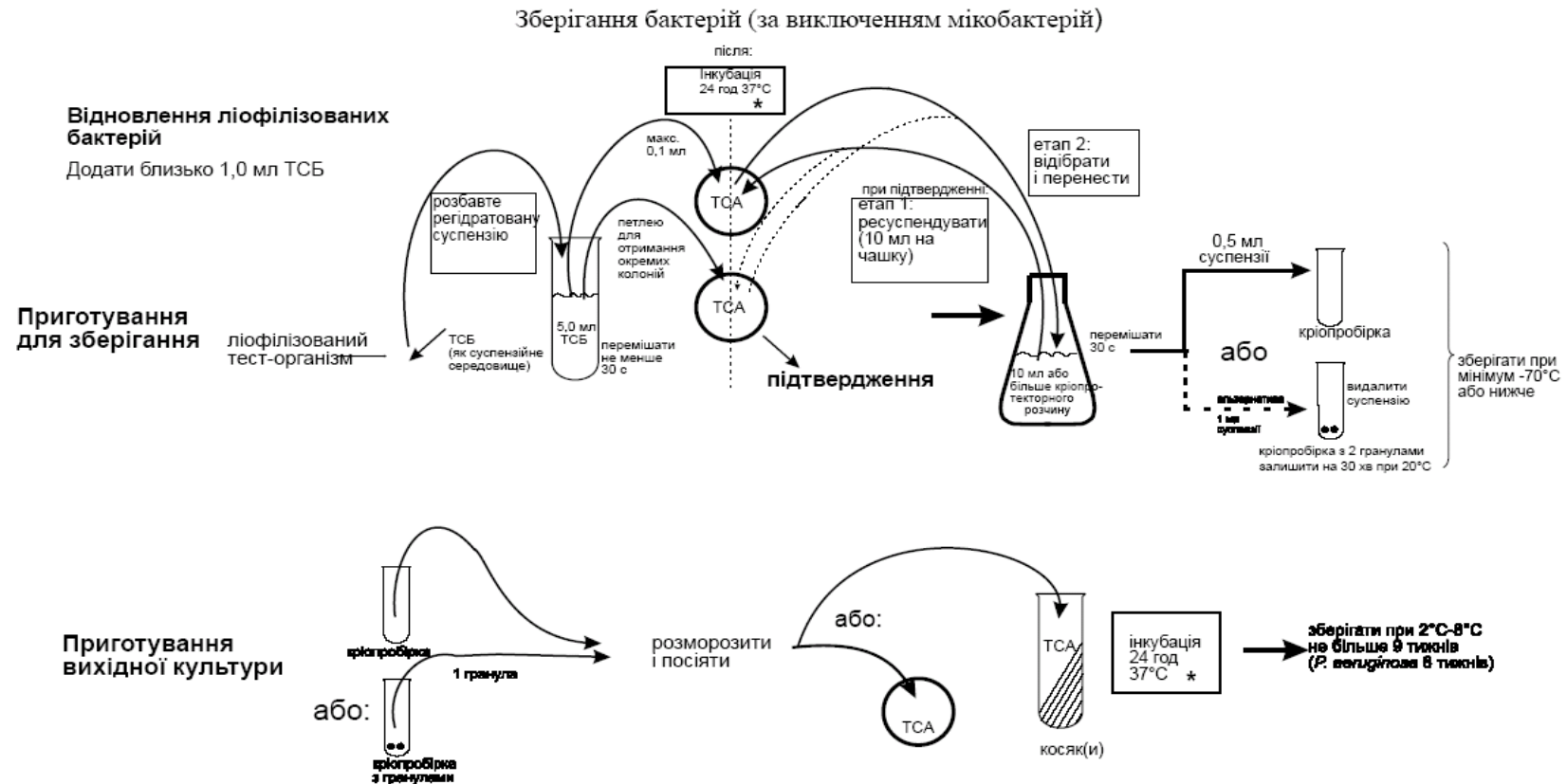
Додаток 3
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(пункт 3 розділу II)

ПЕРЕЛІК СХЕМ ДОСЛІДІВ ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ,
ФУНГІЦИДНОЇ, МІКОБАКТЕРИЦИДНОЇ, ТУБЕРКУЛОЦИДНОЇ,
СПОРОЦИДНОЇ АКТИВНОСТЕЙ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ

- 1 Зберігання бактерій (за виключенням мікобактерій)
- 2 Зберігання мікобактерій
- 3 Зберігання дріжджеподібних грибів
- 4 Зберігання пліснявих грибів
- 5 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації
- 6 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації. Валідація
- 7 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації
- 8 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації. Валідація
- 9 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації (модифікована процедура для готових до використання засобів)
- 10 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації (модифікована процедура для готових до використання засобів). Валідація
- 11 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації (модифікована процедура для готових до використання засобів)
- 12 Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації (модифікована процедура для готових до використання засобів). Валідація
- 13 Визначення мікобактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації
- 14 Визначення мікобактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації. Валідація
- 15 Визначення фунгіцидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації
- 16 Визначення фунгіцидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації. Валідація

- 17 Визначення фунгіцидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації
 - 18 Визначення фунгіцидних концентрацій суспензійним методом. Метод мембранної фільтрації. Валідація
 - 19 Визначення бактерицидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення
 - 20 Визначення бактерицидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення. Валідація
 - 21 Визначення мікобактерицидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення
 - 22 Визначення мікобактерицидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення. Валідація
 - 23 Визначення фунгіцидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення
 - 24 Визначення фунгіцидних концентрацій при знезараженні медичного інструментарію методом занурення. Валідація
-
-

Додаток 4
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



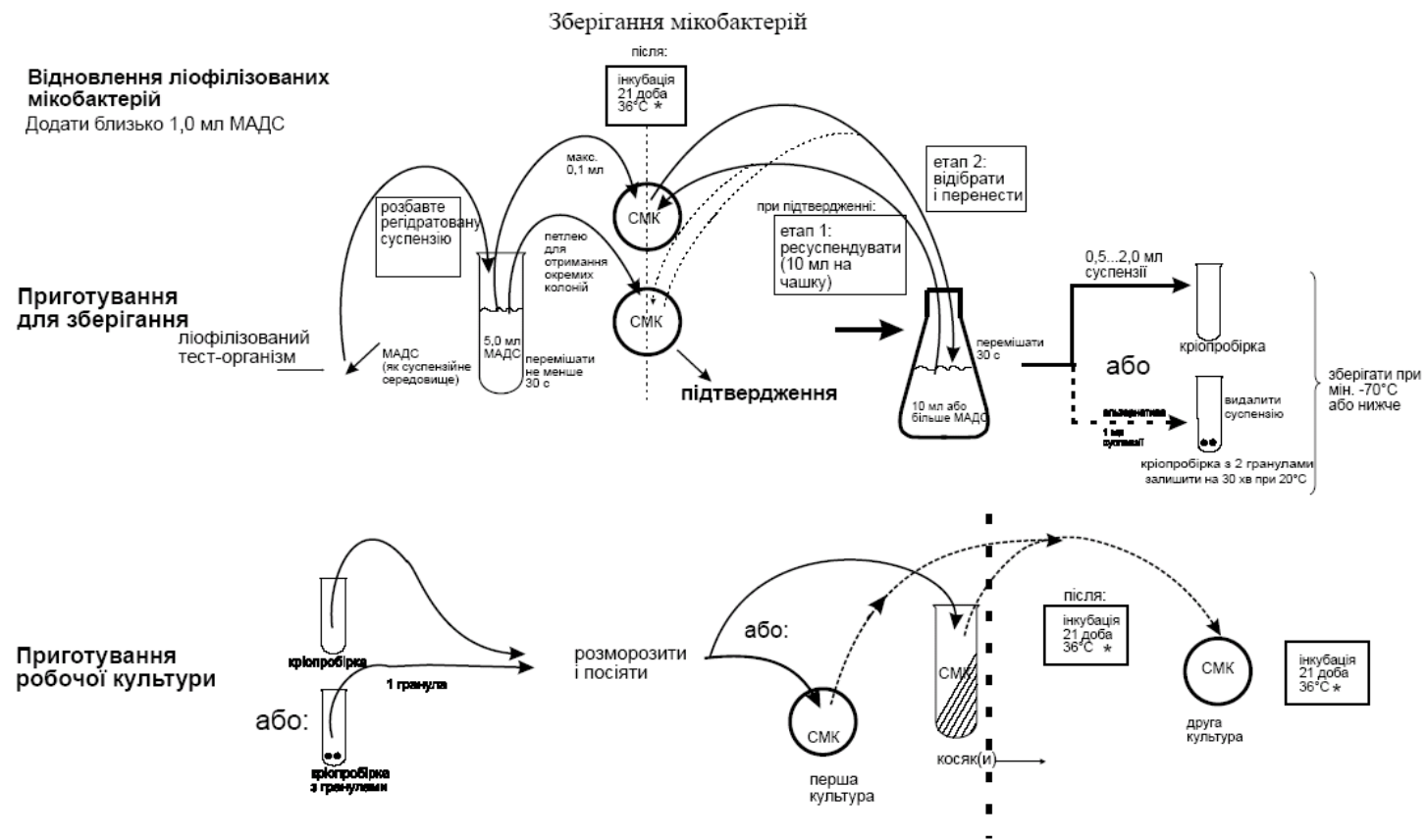
ТСБ = триптонно-соевий бульйон

ТСА = триптонно-соевий агар (приклад)

* (приклад)

Додаток 5

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

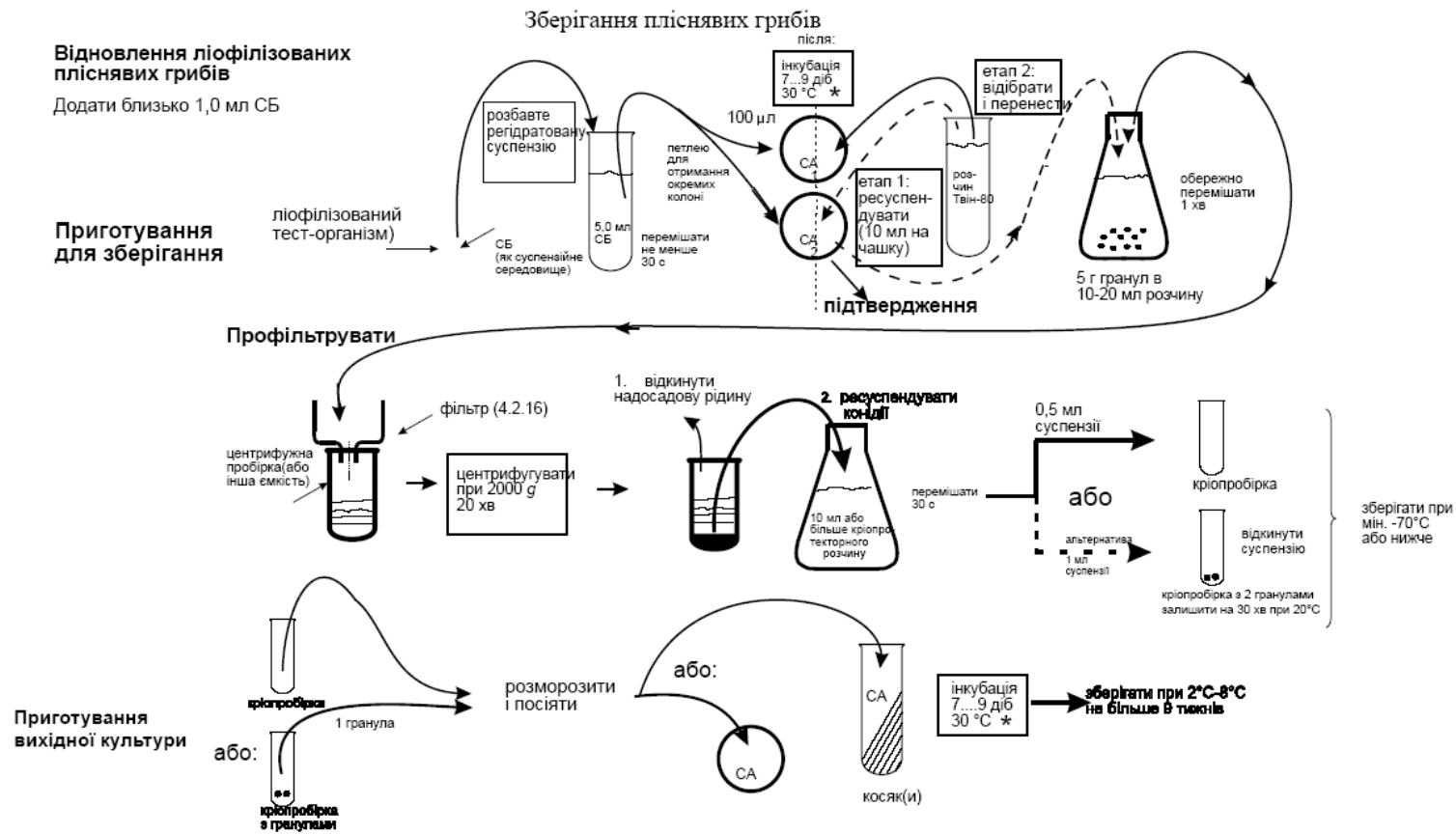


МАДС = Мідлбрук 7Н9 бульйон з 10% АДС збагаченням і гліцеролом

СМК= середовище Мідлбрук-Кон 7Н10 агар з 10% ОАДС збагаченням (приклад)

* приклад

Додаток 7
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



СБ = Солодовий бульйон

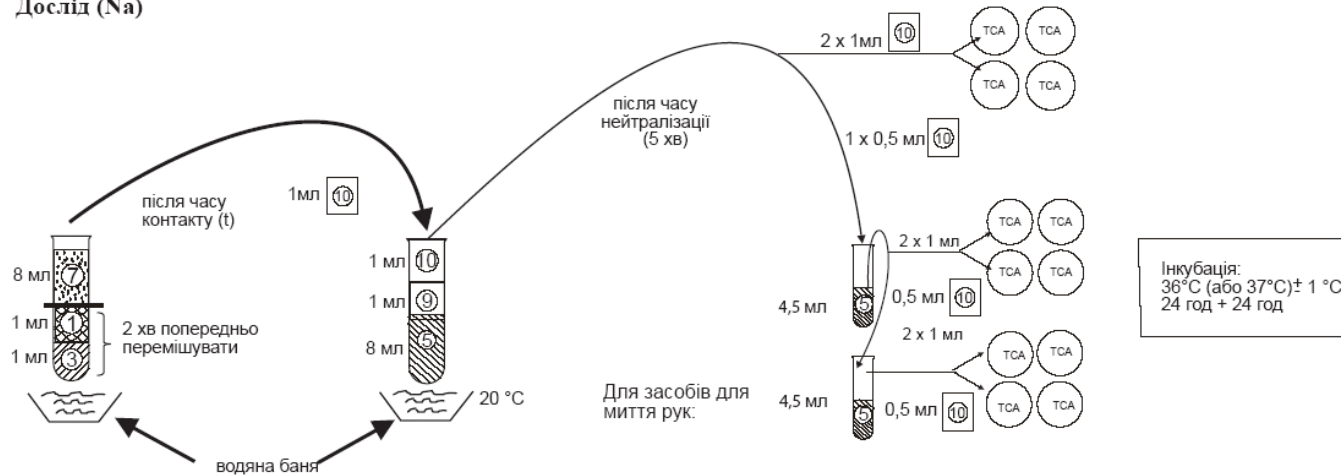
СА = Солодовий агар (приклад)

* приклад

Додаток 8
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом.
Метод розбавлення-нейтралізації

Дослід (Na)



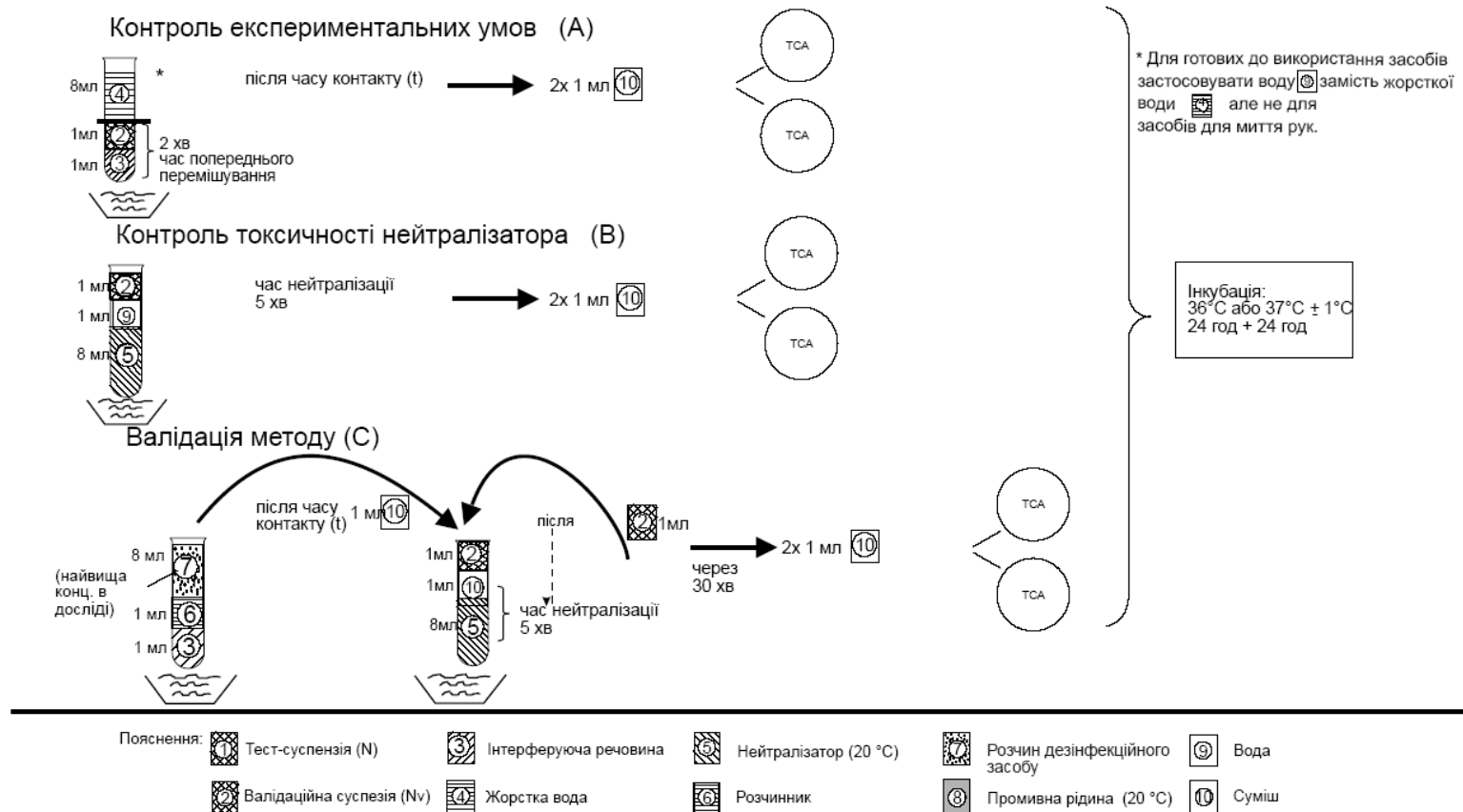
Пояснення:

Тест-суспензія (N)	Інтерферуюча речовина	Нейтралізатор (20 °C)	Розчин дезінфекційного засобу	Вода
Валідаційна суспензія (Nv)	Жорстка вода	Розчинник	Промивна рідина (20 °C)	Суміш

Додаток 9

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

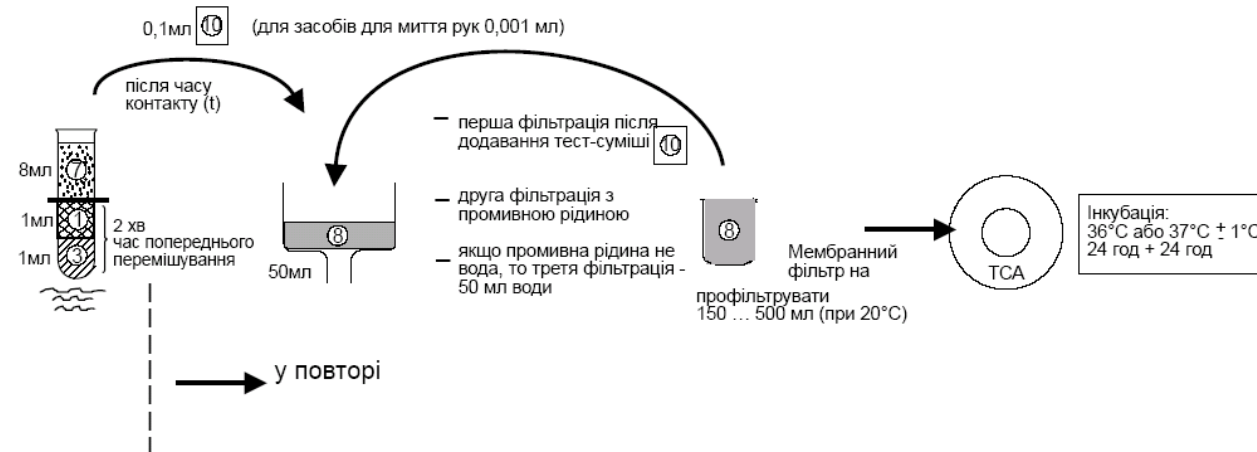
Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом. Метод розбавлення-нейтралізації. Валідація



Додаток 10
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом.
Метод мембранної фільтрації

Дослід (Na)

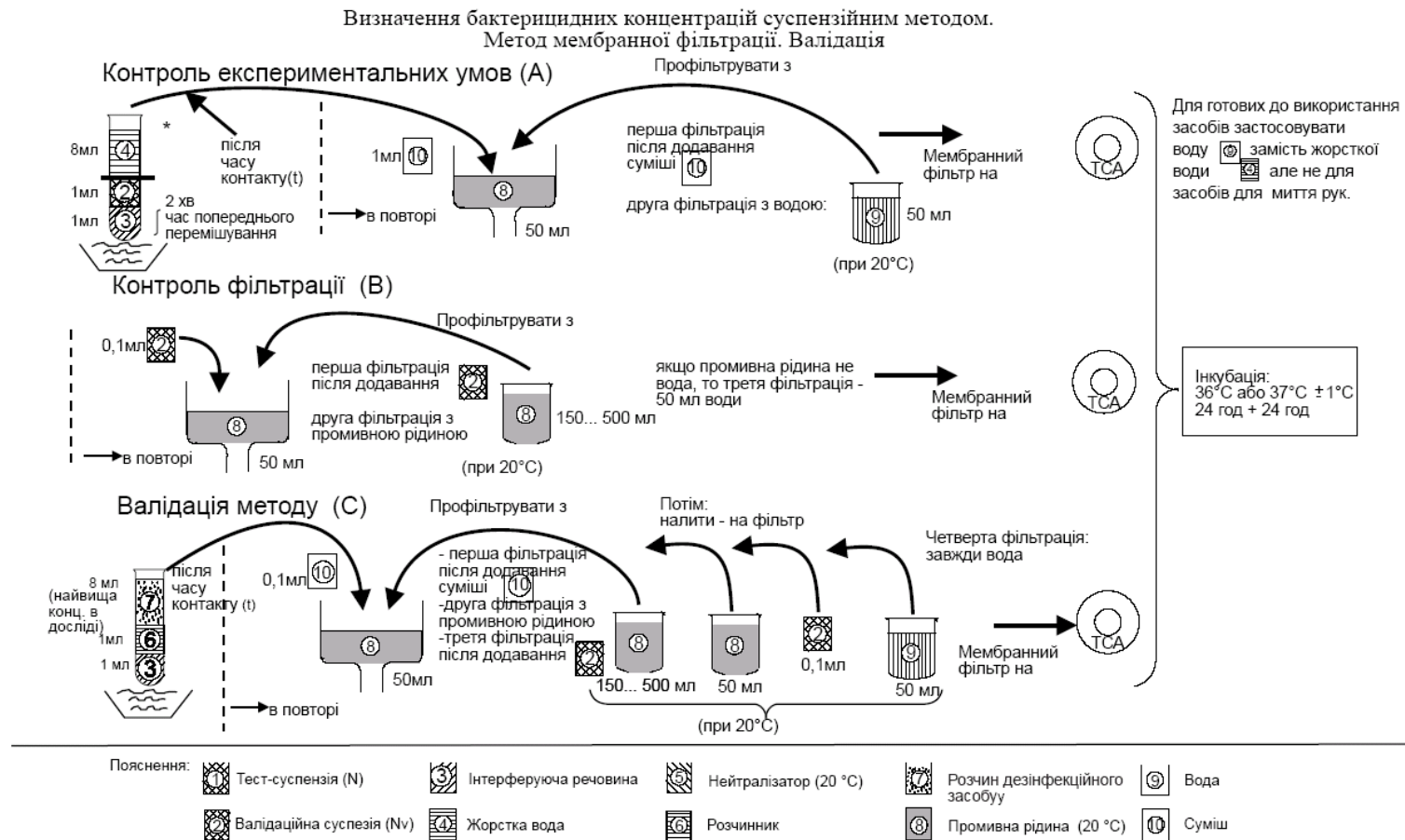


Пояснення:

(1) Тест-суспензія (N)	(3) Інтерферуюча речовина	(5) Нейтралізатор (20 °C)	(7) Розчин дезінфекційного засобу	(9) Вода
(Nv) Валідаційна суспензія	(4) Жорстка вода	(6) Розчинник	(8) Промивна рідина (20 °C)	(10) Суміш

Додаток 11

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

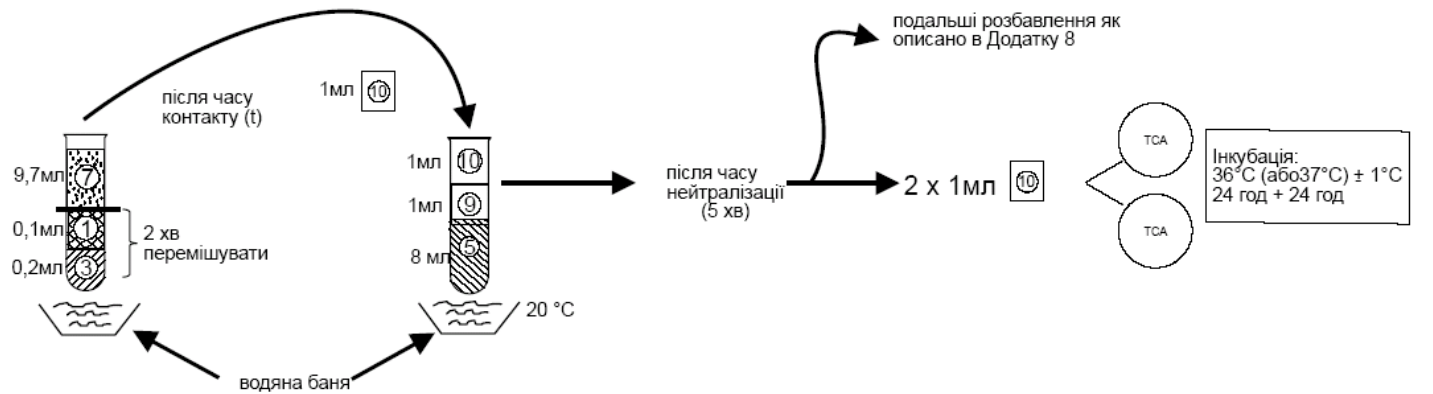


Додаток 12

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

Визначення бактерицидних концентрацій суспензійним методом.
Метод розбавлення-нейтралізації (модифікована процедура для готових до використання засобів)

Дослід (Na)

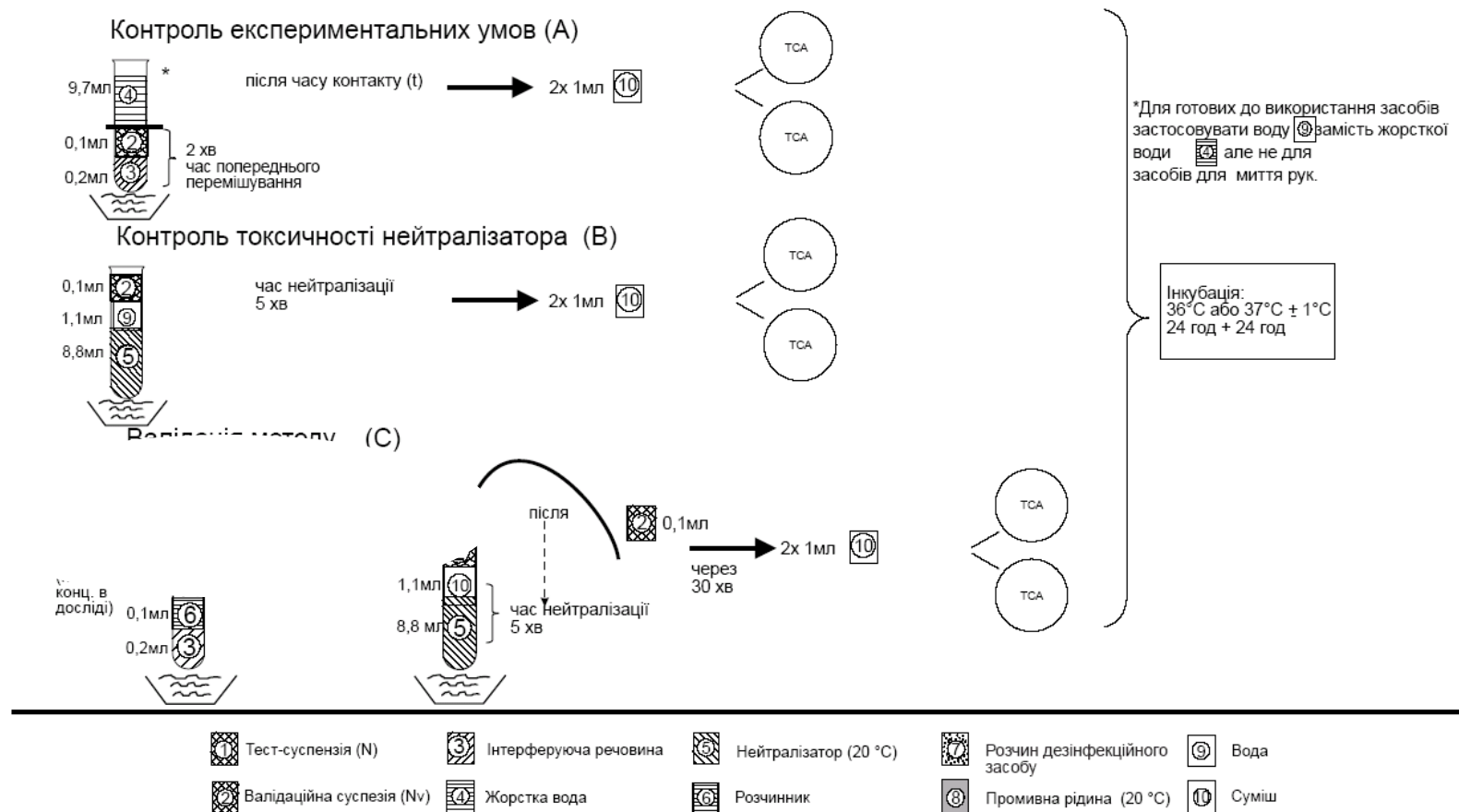


Пояснення:

7	Тест-суспензія (N)	3	Інтерферуюча речовина	5	Нейтралізатор (20 °C)	7	Розчин дезінфекційного засобу	9	Вода
2	Валідаційна суспензія (Nv)	4	Жорстка вода	6	Розчинник	8	Промивна рідина (20 °C)	10	Суміш

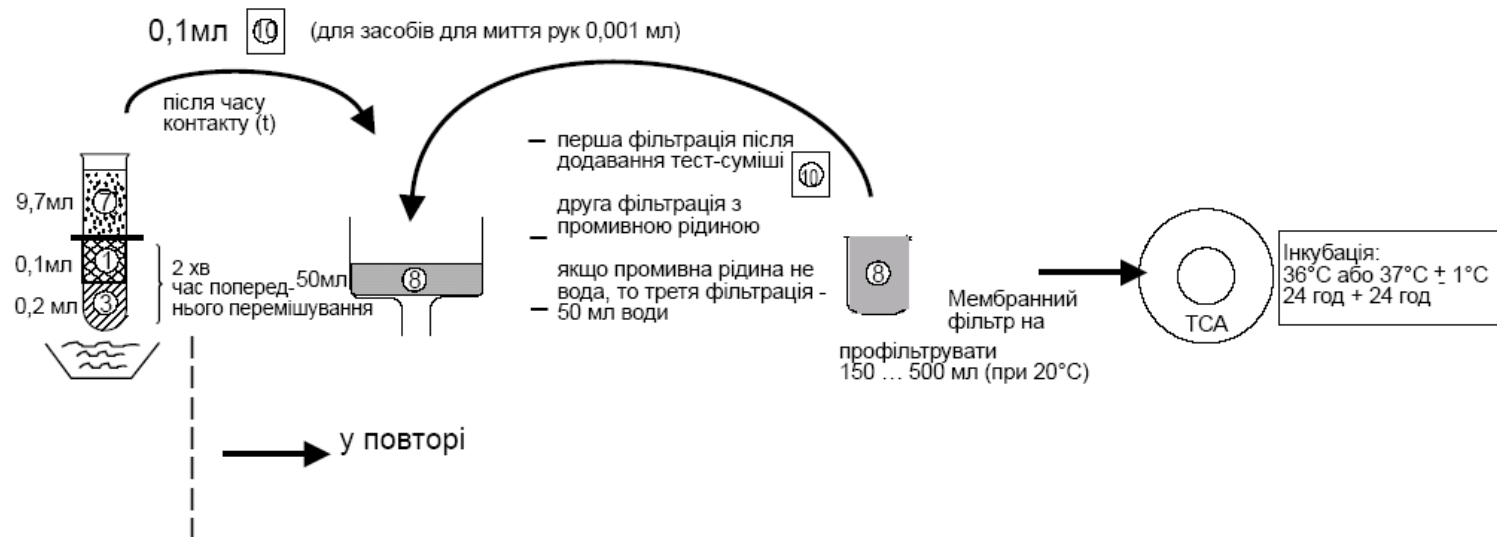
Додаток 13

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



Додаток 14
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

Дослід (Na)



Пояснення:



① Тест-суспензія (N)
(1,5 - 5,0 x 10⁶)



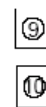
③ Інтерферуюча речовина
(5-кратна концентрація)



⑤ Нейтралізатор (20 °C)



⑦ Розчин дезінфекційного засобу



⑨ Вода



② Валідаційна суспензія (Nv)



④ Жорстка вода



⑥ Розчинник



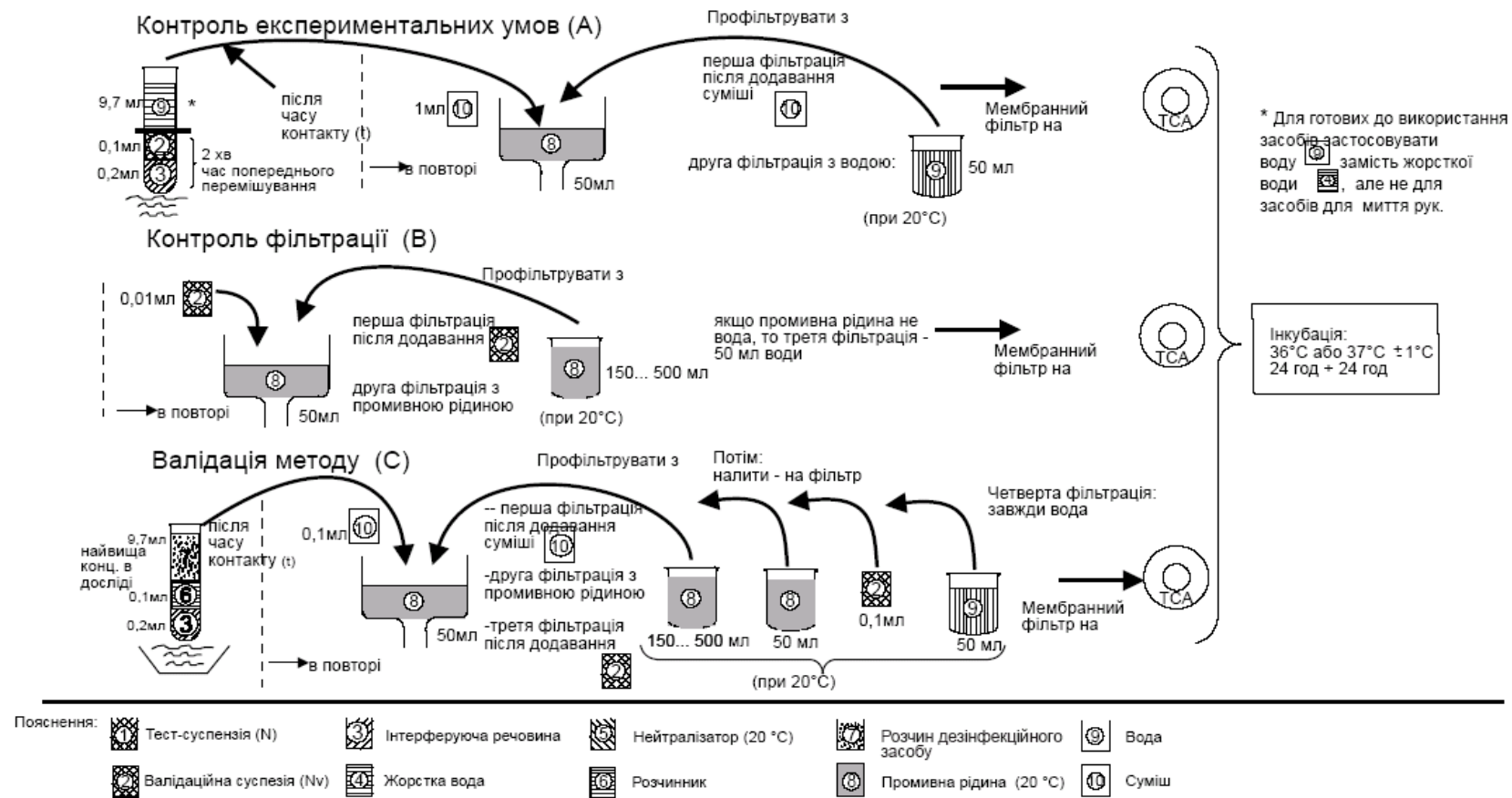
⑧ Промивна рідина (20 °C)



⑩ Суміш

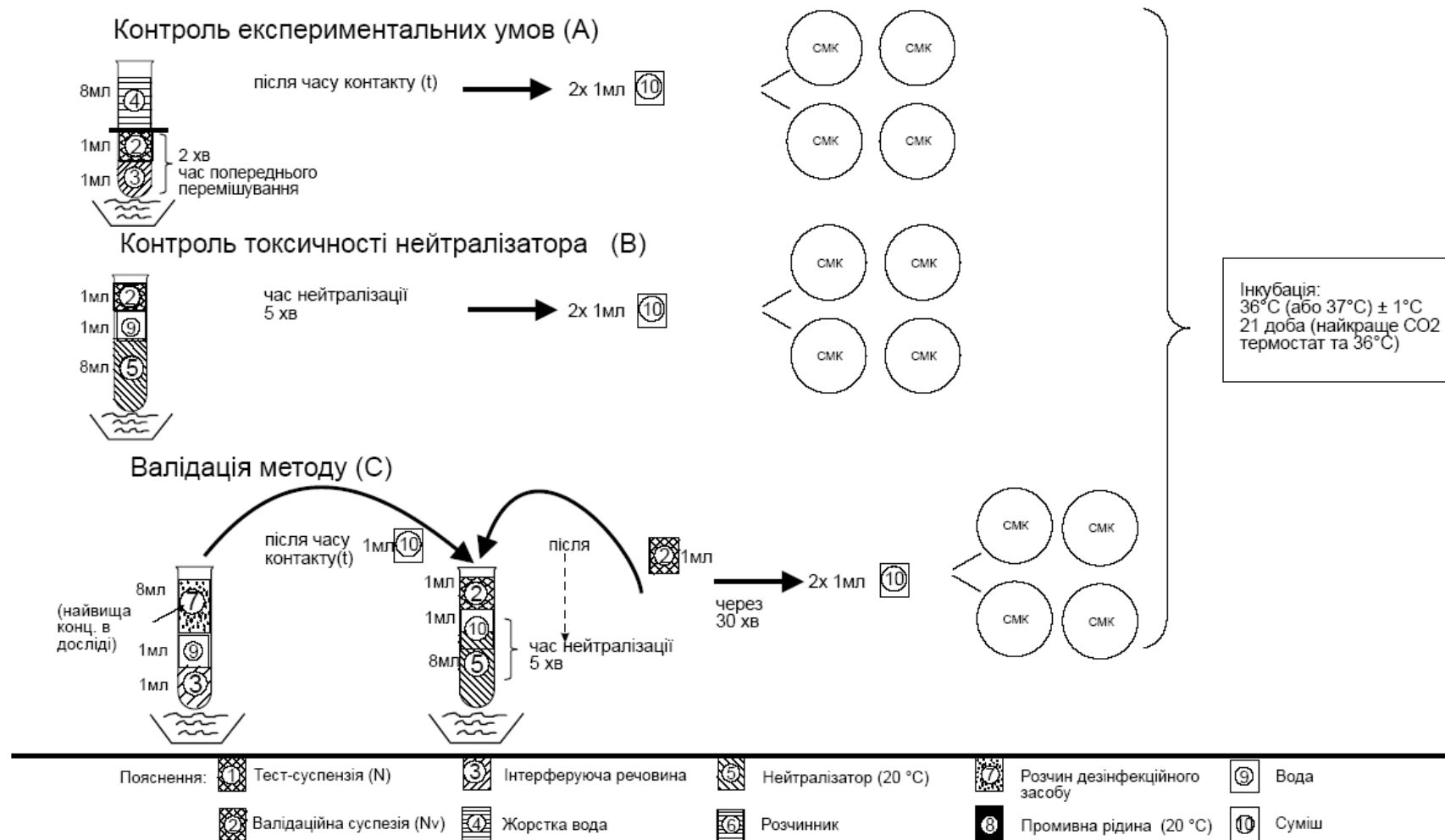
Додаток 15

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



Додаток 17

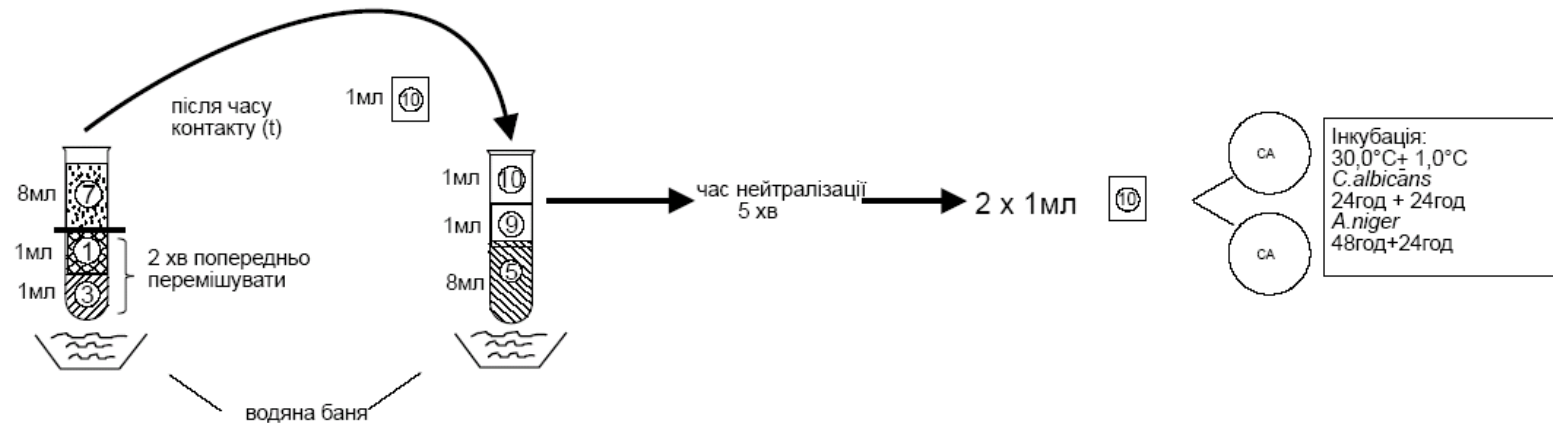
до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



Додаток 18

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

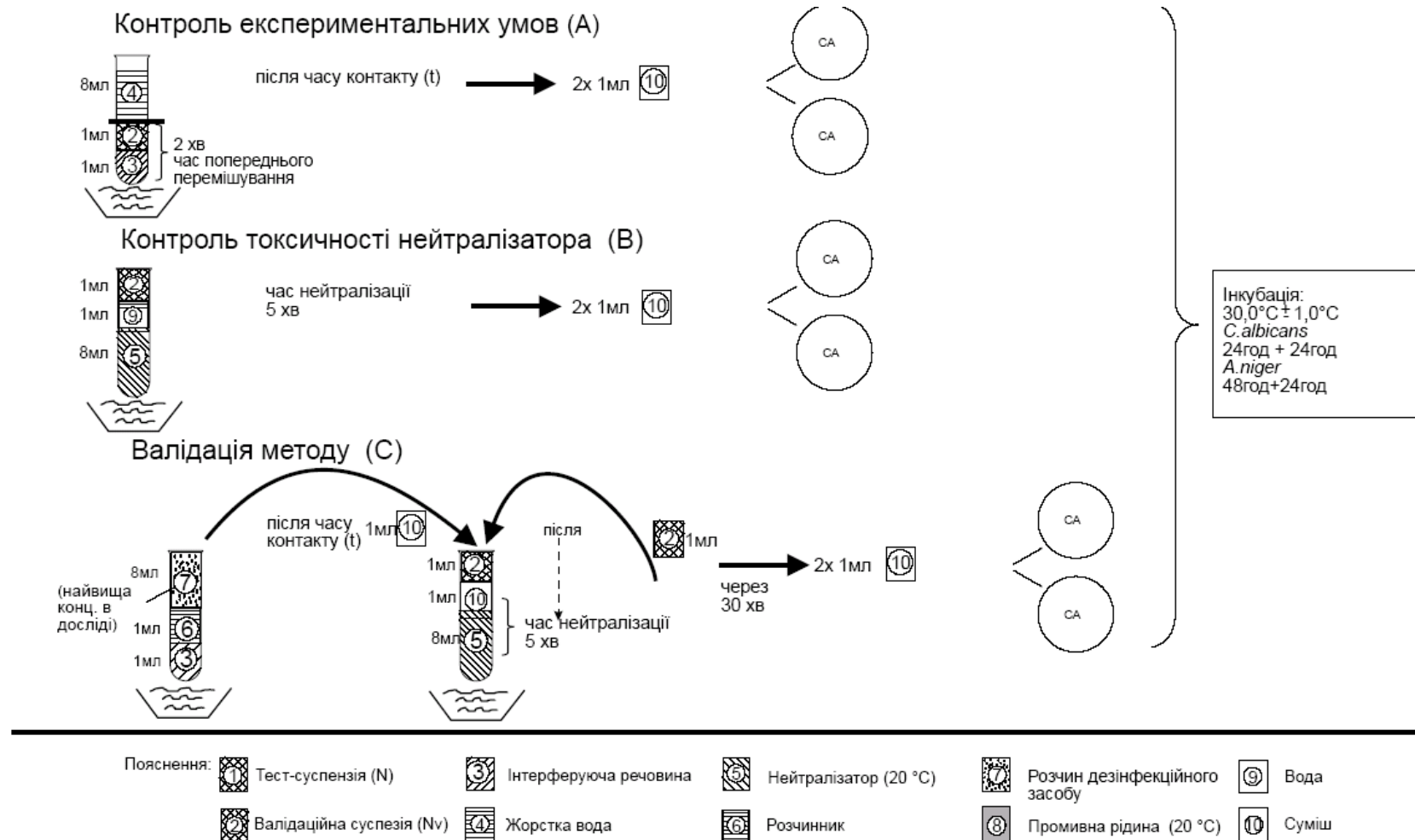
Дослід (Na)



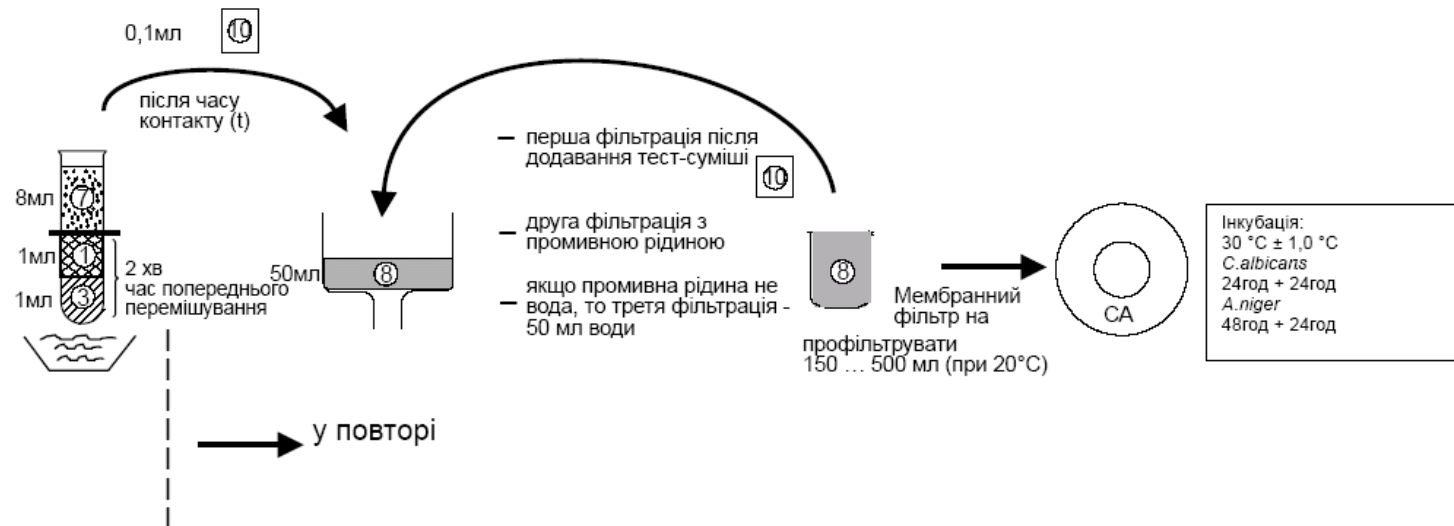
Пояснення:

1	Тест-суспензія (N)	3	Інтерферуюча речовина	5	Нейтралізатор (20 °C)	7	Розчин дезінфекційного засобу	9	Вода
2	Валідаційна суспензія (Nv)	4	Жорстка вода	6	Розчинник	8	Промивна рідина (20 °C)	10	Суміш

Додаток 19
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



Додаток 20
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

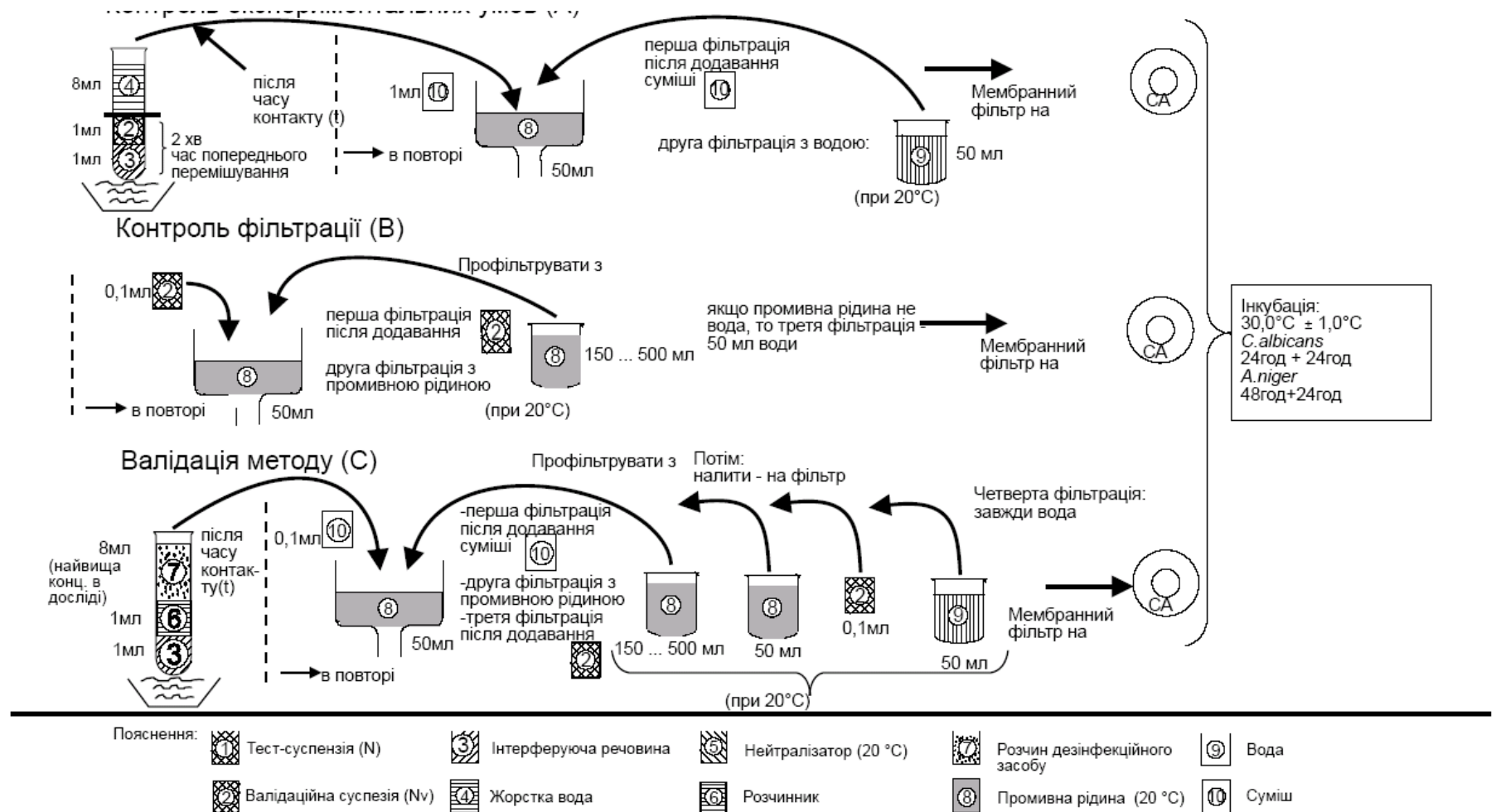


Пояснення:

1	Тест-суспензія (N)	3	Інтерферуюча речовина	5	Нейтралізатор (20 °C)	7	Розчин дезінфекційного засобу	9	Вода
2	Валідаційна суспензія (Nv)	4	Жорстка вода	6	Розчинник	8	Промивна рідина (20 °C)	10	Суміш

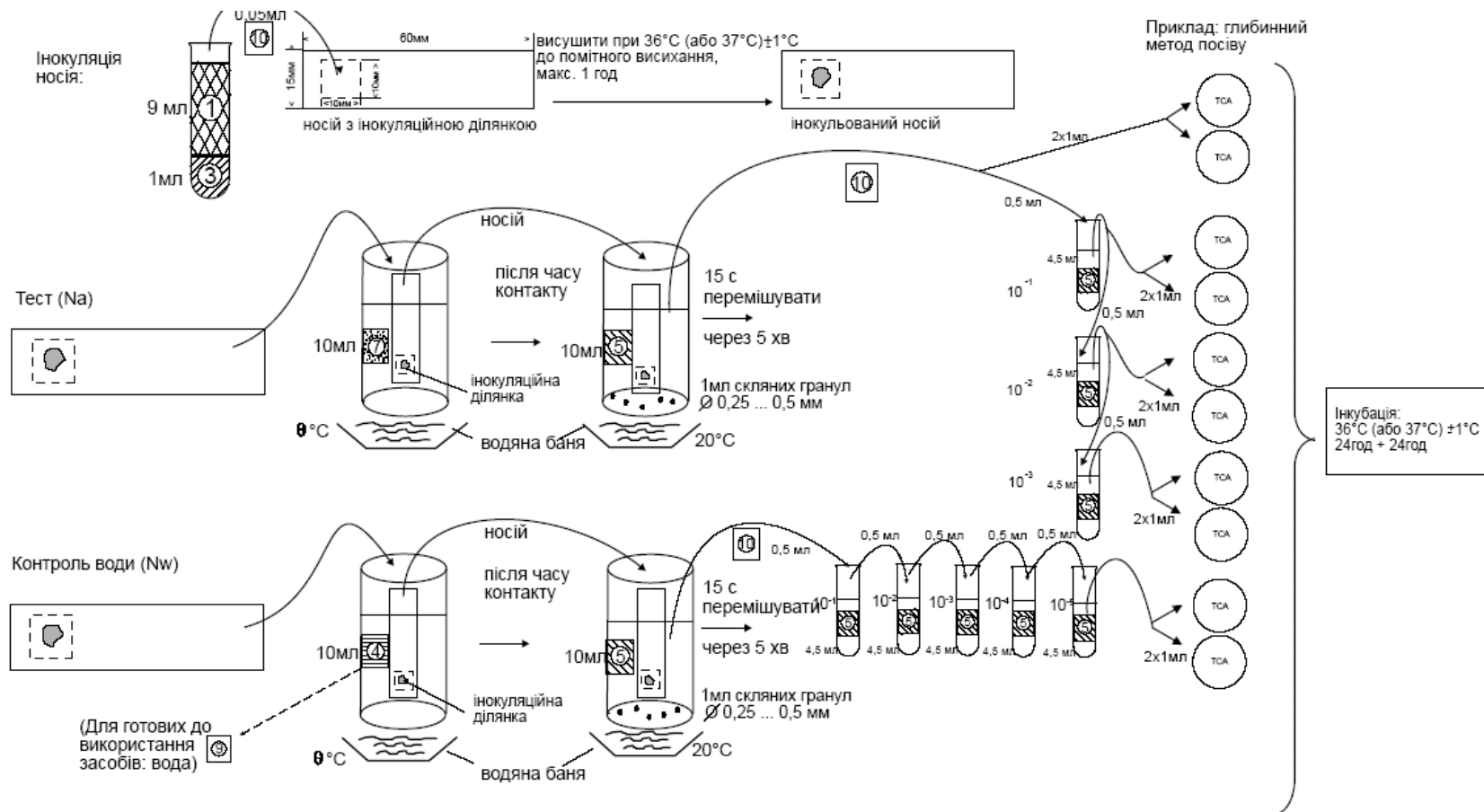
Додаток 21

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



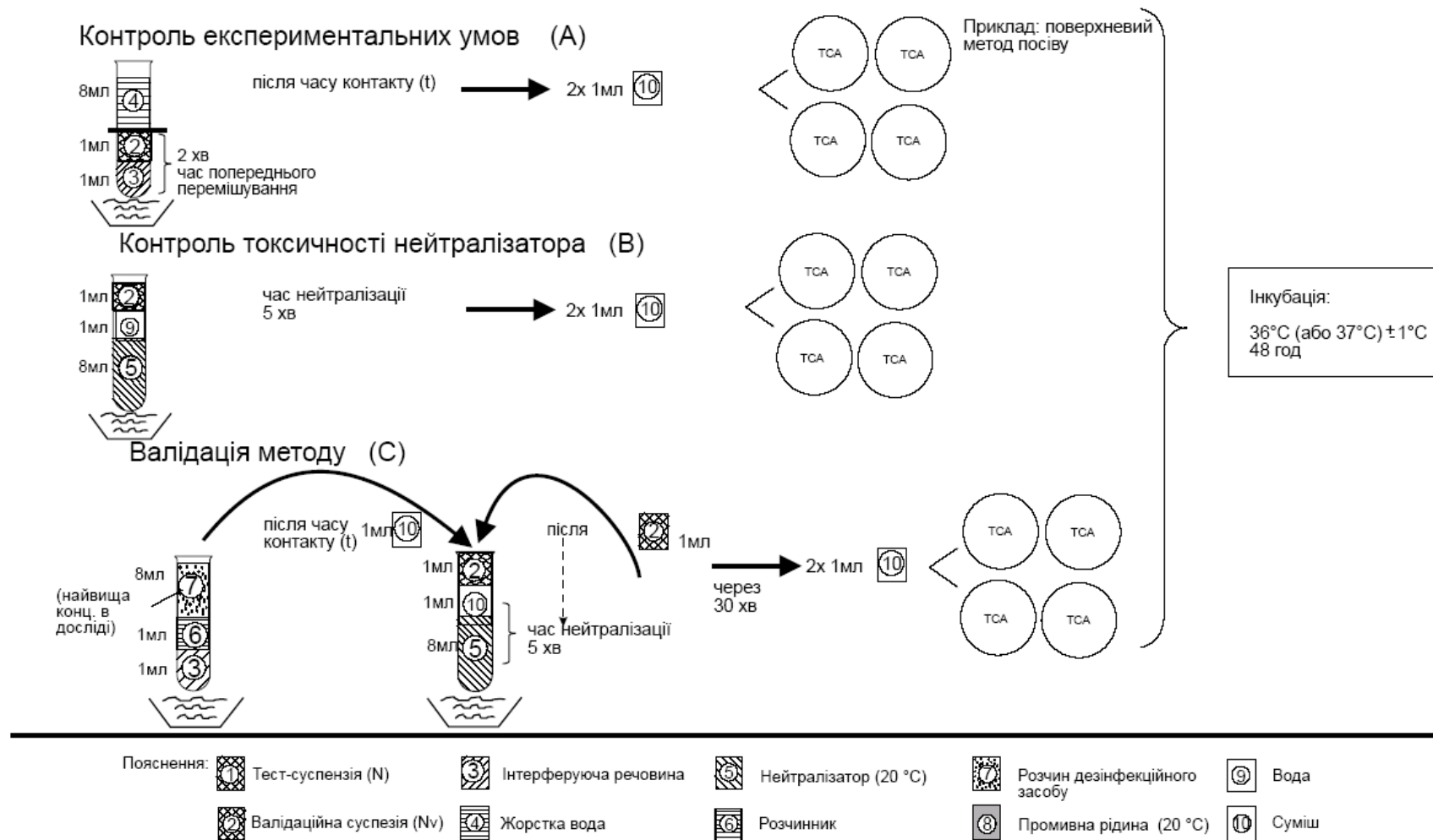
Додаток 22

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

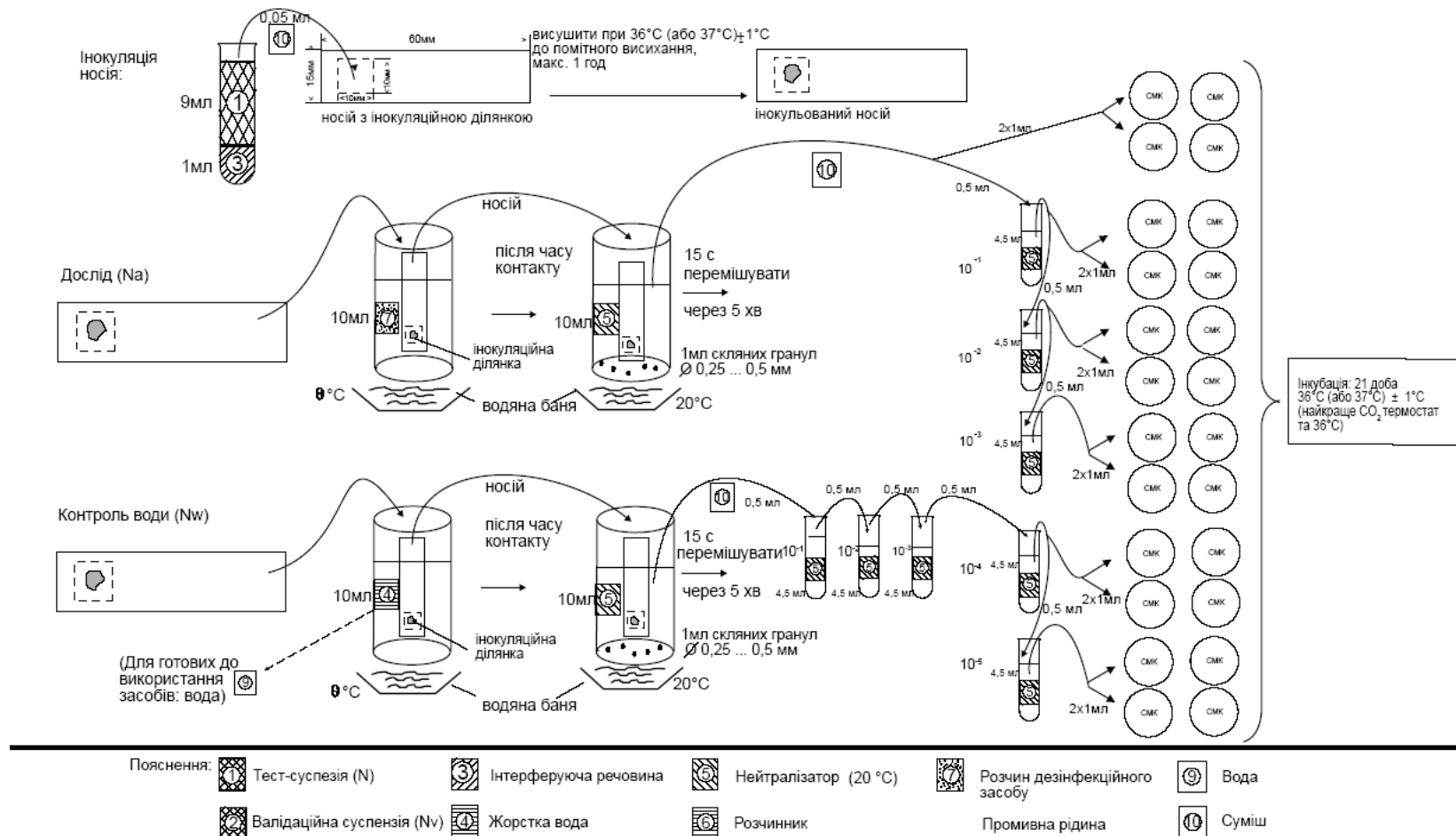


Додаток 23

до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

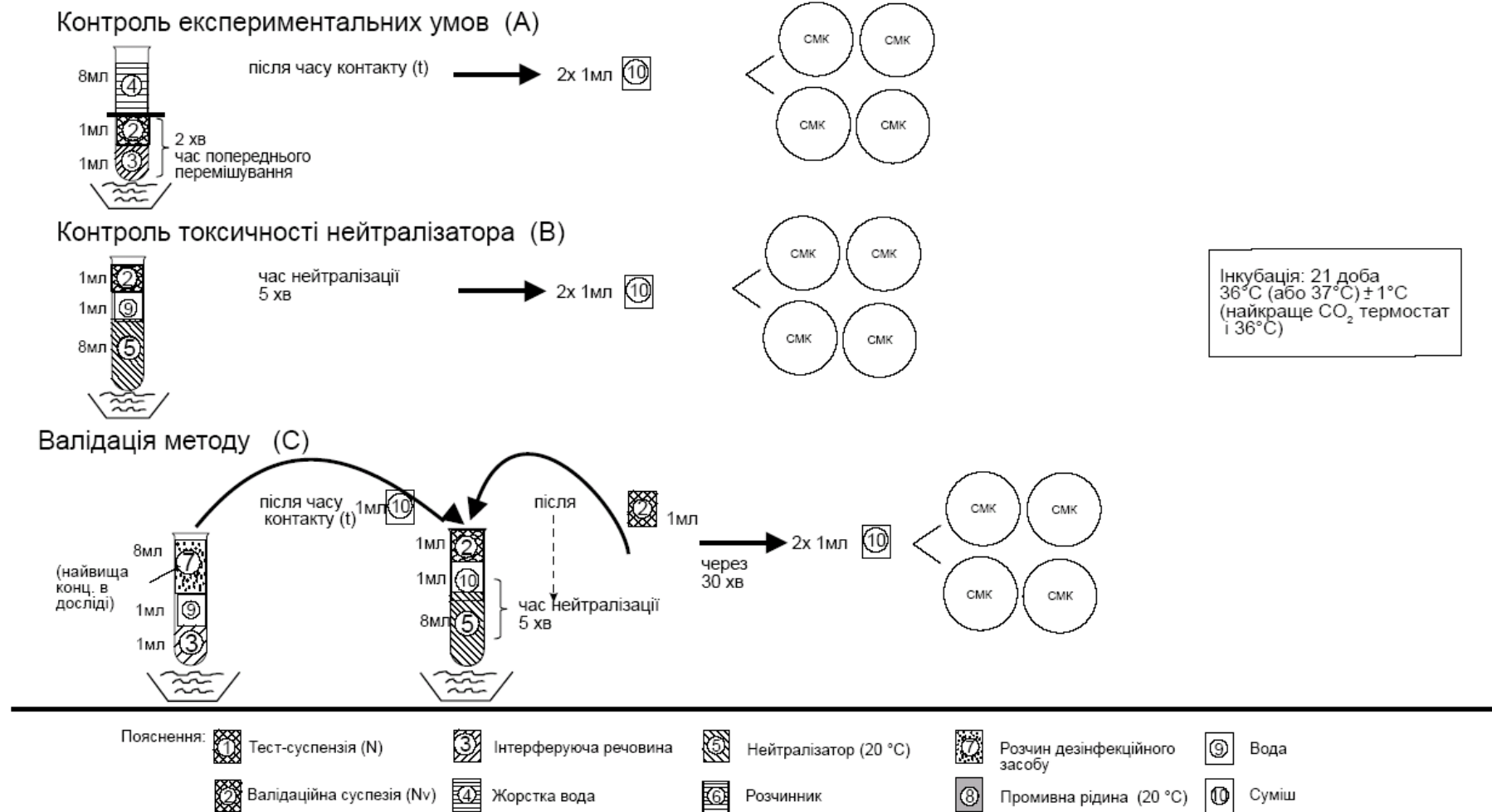


до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)

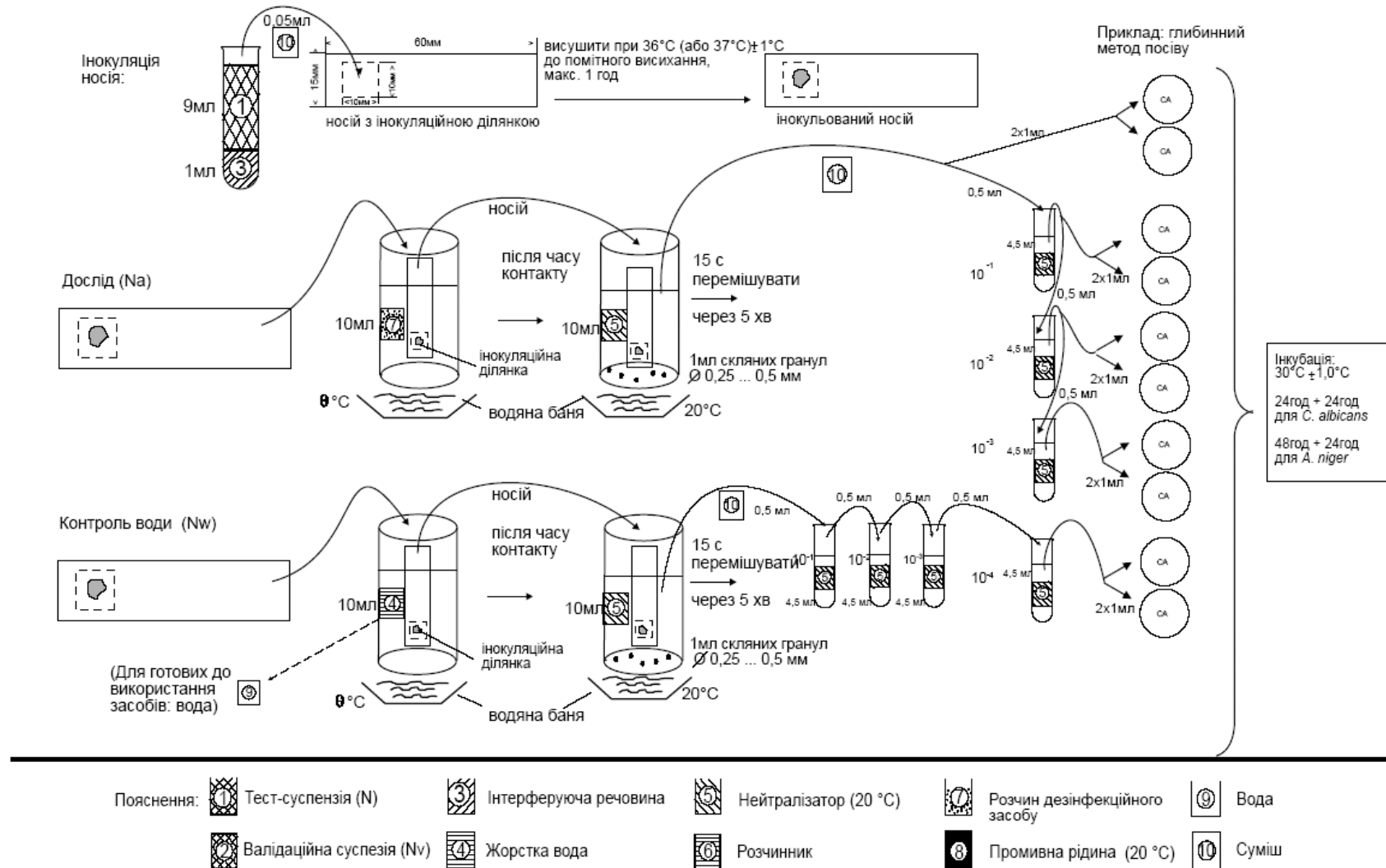


Додаток 25

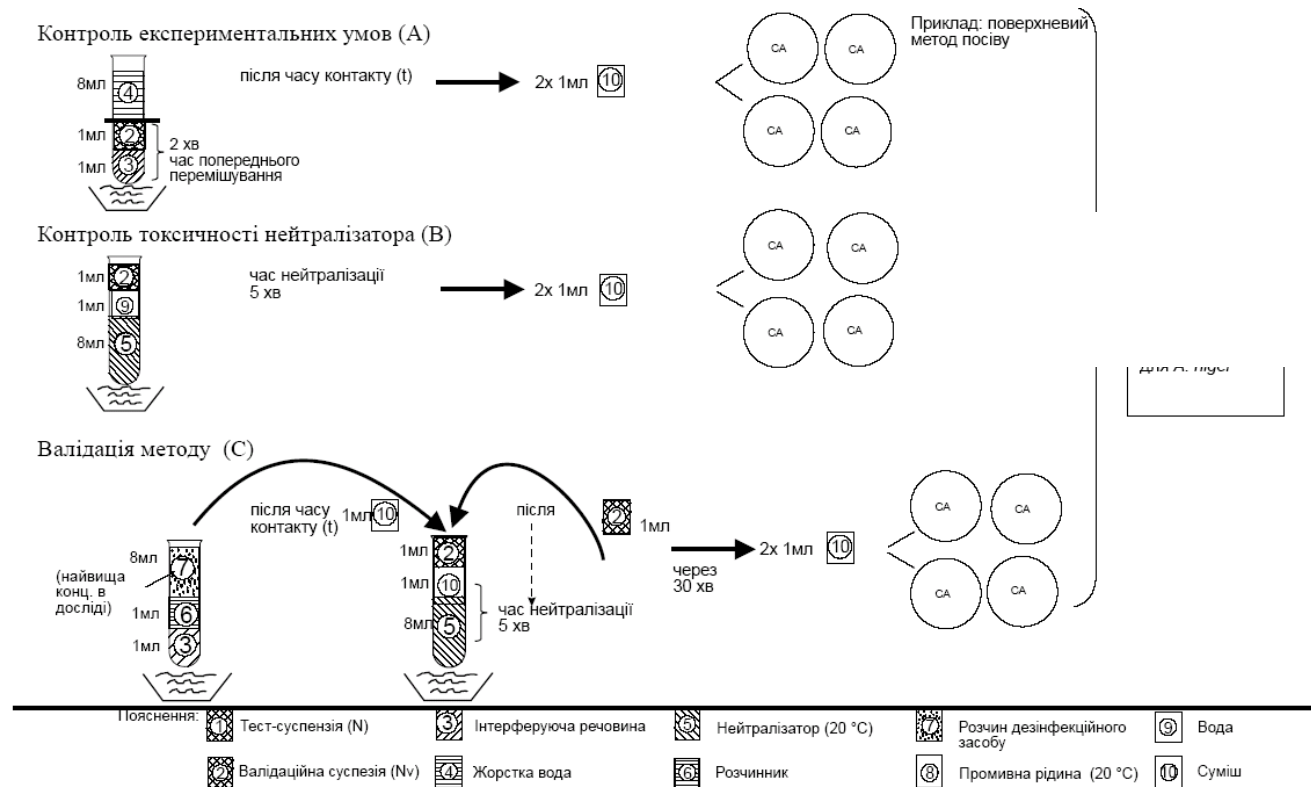
до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



до Методів проведення досліджень специфічної активності, безпечності, якості (ефективності) дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці (підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



Додаток 27
до Методів проведення досліджень специфічної
активності, безпечності, якості (ефективності)
дезінфекційних засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.6 пункту 3 розділу II)



зона другого рівня біологічної безпеки (BSL 2); II зона третього рівня біологічної безпеки (BSL 3)

Додаток 28
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (підпункт 4.4.
пункту 4 розділу II)

Точність результатів визначення спороцидної дії

Контроль суспензії спор за допомогою стандартних розчинів

Log редукції суспензій бактеріальних спор мають бути наступними:

стандартний розчин ГА

термін контакту 30 хв

<i>B. cereus</i> (1,0 % ГА)	$3,45 \pm 0,7$
<i>B. subtilis</i> (3,0 % ГА)	$1,55 \pm 1,15$

стандартний розчин надоцтової кислоти (НОК)

термін контакту 15 хв

<i>B. cereus</i> (0,1 % НОК)	$1,25 \pm 0,5$
<i>B. subtilis</i> (0,05 % НОК)	$2,4 \pm 0,4$

Додаток 29
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (пункт 9 розділу II)

Перевірка якості рідкого мила

Методи

Ідентифікація: при додаванні розведеної сірчаної кислоти (H_2SO_4) до розчину калієвого (напіврідкого) мила вільні жирні кислоти будуть виділятися у вигляді білого осаду, що при слабкому нагріванні розплавиться на жирні крапельки на поверхні рідини.

Чистота: 1 г калієвого (напіврідкого) мила має розчинитися в $2,0 \text{ см}^3$ теплої води, і утворити прозору рідину.

Речовини, нерозчинні в спирті: розчиніть 2,50 г калієвого (напіврідкого) мила в $10,0 \text{ см}^3$ 96,0 % етанолу при слабкому нагріванні. Профільтруйте теплий розчин через фільтруючий тигель, просушений до постійної ваги, і обережно повторно промийте 96,0 % етанолом. Вага нерозчинного залишку, що зібрався в тиглі, не повинна перевищувати 5 мг після просушування.

Вільний луг, вільна кислота: розчин 2,5 г калієвого мила в $10,0 \text{ см}^3$ 96,0 % етанолу для нейтралізації розчину фенолфталеїну не повинний споживати більш, ніж $0,1 \text{ см}^3$ н соляної кислоти або $0,1 \text{ см}^3$ розчину гідроокису натрію.

Втрати при просушуванні: максимум 45,0 %. Для визначення спочатку перемеліть калієве (напіврідке) мило з рівною кількістю промитого і прожареного морського піску, потім просушіть у відповідності зі специфікацією.

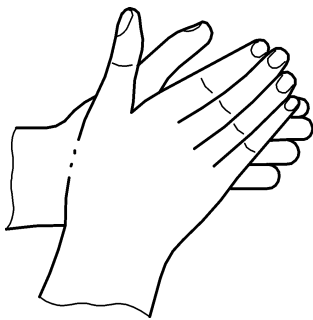
Визначення вмісту: Розчиніть 2,500 г калієвого мила в $50,0 \text{ см}^3$ гарячої води у колбі Ерленмейера; змішайте розчин з $5,0 \text{ см}^3$ розведеної сірчаної кислоти 10,0% R і слабо нагрівайте до виділення жирних кислот у вигляді масляної плівки на поверхні водної рідини. Після охолодження додайте $10,0 \text{ см}^3$ ефіру нафтолу і обережно перемішайте по колу до розчинення жирних кислот. Потім внесіть усю рідину в $250,0\text{-см}^3$ поділяючу лійку, знову двічі промийте, щоразу з $10,0 \text{ см}^3$ ефіру нафтолу і енергійно струсніть. Після поділу шарів дайте стекти водній фазі, промийте ефір нафтолу й енергійно струсніть. Після поділу шарів дайте стекти водній фазі, промийте розчин ефіру нафтолу $25,0 \text{ см}^3$ води і знову дайте стекти водній фазі як можна більш повно. Потім добре струсніть з ангідридом сульфату натрію. Профільтруйте через вату в бітумованій колбі на $200,0 \text{ см}^3$, двічі промийте, щоразу з $5,0 \text{ см}^3$ ефіру нафтолу й продистильуйте розчинник на водяній бані. Дайте залишкові просохнути при температурі не вище $(75,0 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Залишок має важити 1,125 - 1,250 г відповідно до вмісту від 45,0 % до 50,0 % жирних кислот.

Додаток 30
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (пункт 9 розділу II)

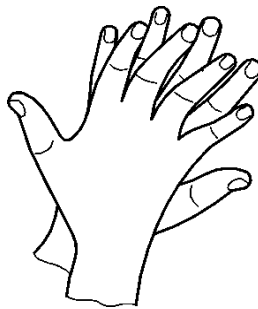
Стандартна процедура обробки рук

Внесіть необхідну кількість засобу для миття/обробки рук, у складені чашею долоні, і вимийте/обробіть руки у відповідності зі стандартною процедурою миття/обробки рук наведену нижче, впевнюючись у повному покритті рук. Кожен етап повторити 5 раз до переходу до іншого етапу. Після виконання 6-го етапу повторіть всі етапи до завершення повного часу миття/обробки.



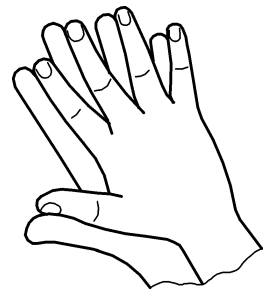
Етап 1

Долоню на долоню



Етап 2

Праву долоню на ліву тильну сторону
руки, а ліву долоню на праву тильну
сторону руки



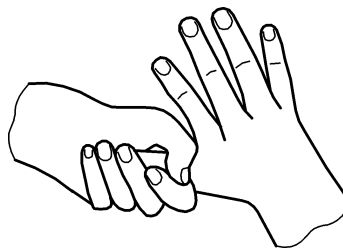
Етап 3

Долоню на долоню з перехрещеними,
розведеними пальцями



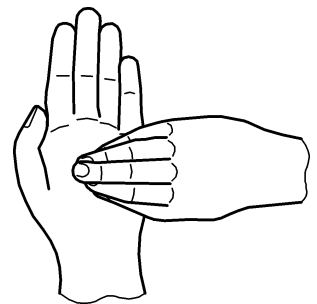
Етап 4

Зовнішню сторону пальців на протилежні
долоні зі зчепленими пальцями



Етап 5

Лівою долонею затиснути великий
палець правої руки і терти його
круговими рухами (аналогічно для правої
руки)



Етап 6

Крутити у змінному напрямку зведені
пальці правої руки і терти ліву долоню і
навпаки

Додаток 31
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (пункт 9 розділу II)

Приклади наведення результатів та оцінки їх значимості для засобів гігієнічної обробки рук

Таблиця 1. Еталонна процедура миття рук – експериментальні дані

Еталон: рідке мило

Застосування (еталонний засіб для миття рук): 5,0 см³ на попередньо зволожені руки, мити протягом 1 хв, змивати 15 с

Дата експерименту: 15.10.2007

Тест-мікроорганізм: *E. coli* K 12 NCTC 10538

Суспензія: $2,14 \cdot 10^8$ КУО/см³

Піддослідні особи		Кількість КУО на чашці з розбавлення 10 ^x				
№ п/п	Рука	Перед обробкою		Після обробки		
	права або ліва	10 ⁻⁴ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻³)	10 ⁻⁵ (посів 0,1 мл з 10 ⁻⁴)	10 ⁰ (посів 1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)
1	л	198*	18*	> 330	206*	31*
	п	66	6	> 330	203*	25*
2	л	55	4	> 330	210*	21*
	п	131	10	> 330	> 330	39
3	л	> 330	47	> 330	108	4
	п	99	6	> 330	87	7
4	л	189	12	> 330	> 330	54
	п	181*	19*	> 330	> 330	31
5	л	47	3	> 330	185*	16*
	п	137	9	> 330	135	13
6	л	57	8	> 330	> 330	280
	п	82	11	> 330	151*	19*
7	л	> 330	64	> 330	214*	26*
	п	н.в.	23	> 330	223*	26*
8	л	198*	18*	> 330	291	0
	п	217*	16*	> 330	289*	35*
9	л	92	8	> 330	83	0
	п	54	7	> 330	64	11
10	л	32	2	> 330	> 330	54
	п	56	5	> 330	> 330	33
11	л	211	7	> 330	> 330	46
	п	107	12	> 330	> 330	53
12	л	131*	15*	32	5	0
	п	97	6	115	7	1
13	л	154	9	> 330	> 330	58
	п	181*	15*	> 330	> 330	73
14	л	123	13	> 330	223*	26*
	п	119	11	> 330	187*	21*
15	л	31	3	> 330	104	12
	п	49	4	> 330	182*	20*

Підкреслене = значення, яке враховується при подальших підрахунках

* = використовуються значимі середні

Задача: XX

Застосування (засіб для миття рук): 3,0 см³ на сухі руки, додати теплу воду, мити протягом 30 с, змивати 15 с

Дата експерименту: 24.10.2007

Тест-мікроорганізм: E. coli K 12 NCTC 10538

Суспензія: $2,14 \cdot 10^8$ КУО/см³

Піддослідні особи		Кількість КУО на чашці з розбавлення 10 ^х				
№ п/п	Рука права або ліва	Перед обробкою		Після обробки		
		10 ⁻⁴ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻³)	10 ⁻⁵ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻⁴)	10 ⁰ (посів 1,0 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)
1	л	59	3	42	0	0
	п	17	3	13	0	0
2	л	92	8	299*	19*	1
	п	86	7	223	0	0
3	л	148	11	44	3	0
	п	111	7	38	2	0
4	л	57	6	154	9	3
	п	74	8	104	7	0
5	л	32	3	217*	19*	2
	п	36	4	187*	18*	1
6	л	46	5	251	0	0
	п	62	5	110	0	0
7	л	200*	24*	135	0	0
	п	190*	17*	67	0	0
8	л	116	9	> 330	33	4
	п	99	5	> 330	29	3
9	л	148*	19*	49	0	0
	п	105	9	36	3	0
10	л	76	7	> 330	153*	20*
	п	72	3	> 330	44	8
11	л	114	13	8	6	2
	п	172*	20*	293	0	0
12	л	155*	19*	125	5	1
	п	183*	17*	249	12	3
13	л	235*	21*	156	2	0
	п	286*	26*	246	6	2
14	л	253*	33*	154	5	0
	п	> 330	92	174	3	0
15	л	11	0	56	3	0
	п	13	0	55	3	1

Підкреслене * = значення, яке враховується при подальших підрахунках
 * = використовують значимі середні

Таблиця 3. Перелік підрахованих значень lg (середні для лівої і правої руки)
та lg редукції (згідно таблиць 1 і 2 цього додатку)

Піддослідні особи № п/п	Еталонна процедура миття рук (ЕП) (рідке мило)			Процедура миття рук засобом (ДП)		
	lg N	lg N _{ЕП}	lg R	lg N	lg Na	lg R
1	6,06	3,33	2,73	5,50	1,37	4,13
2	5,93	3,46	2,47	5,95	2,41	3,54
3	6,34	2,99	3,35	6,11	1,61	4,50
4	6,27	3,61	2,66	5,82	2,11	3,71
5	5,91	3,20	2,71	5,54	2,30	3,24
6	5,84	3,82	2,02	5,73	2,22	3,51
7	6,59	3,35	3,24	6,30	1,98	4,32
8	6,31	3,47	2,84	6,04	2,49	3,55
9	5,85	2,87	2,98	6,10	1,63	4,47
10	5,63	3,63	2,00	5,87	2,92	2,95
11	6,18	3,69	2,49	6,15	1,69	4,46
12	6,06	1,79	4,27	6,23	2,25	3,98
13	6,22	3,80	2,42	6,41	2,29	4,12
14	6,09	3,32	2,77	6,69	2,22	4,47
15	5,59	3,14	2,45	5,08	1,75	3,33
X	6,06	3,30	2,76	5,97	2,08	3,89
s	0,27	0,50	0,56	0,40	0,41	0,52
n	15	15	15	15	15	15

X = загальні середні lg N, lg N_{ЕП}, lg Na та R
 s = стандартне відхилення
 n = кількість значень в кожній колонці

Таблиця 4. Статистичне порівняння значень, отриманих для ЕП та ДП
(тест Вілкоксона)

Піддослідні особи № п/п	lg R отриманий з		Різниця (lg) ЕП - ДП	Ряд різниць	
	ЕП	ДП		без знака	зі знаком
1	2,73	4,13	- 1,40	10	- 10
2	2,47	3,54	- 1,07	7	- 7
3	3,35	4,50	- 1,15	9	- 9
4	2,66	3,71	- 1,05	6	- 6
5	2,71	3,24	- 0,53	2	- 2
6	2,02	3,51	- 1,49	12	- 12
7	3,24	4,32	- 1,08	8	- 8
8	2,84	3,55	- 0,71	3	- 3
9	2,98	4,47	- 1,49	11	- 11
10	2,98	2,95	- 0,95	5	- 5
11	2,00	4,46	- 1,97	15	- 15
12	4,27	3,98	+ 0,29	1	+ 1
13	2,42	4,12	- 1,70	13,5	- 13,5
14	2,77	4,47	- 1,70	13,5	- 13,5
15	2,45	3,33	- 0,88	4	- 4

R = редукція
 Сума рядів (+): 1
 Сума рядів (-): 119

Порівняти меншу суму рядів (тут 1) з табличними значеннями з таблиці Вілкоксона (згідно таблиці 9 цього додатку) для n = 15 при рівні значимості p = 0,01 (= 19).

Якщо підрахована менша сума рядів (тут 1) ≤ 19, ДП значно ефективніше ніж ЕП

Таблиця 5. Еталонна процедура обробки рук – експериментальні дані

Еталон: 60,0 % 2-пропанол

Застосування (60,0 % 2-пропанол): втирати 3,0 см³/30 с, повторити ще раз

Дата експерименту: 24.10.2007

Тест-мікроорганізм: E. coli K 12 NCTC 10538

Суспензія : $2,14 \cdot 10^8$ КУО/см³

Підслідні особи		Кількість КУО на чашці з розбавлення 10 ^x				
№ п/п	Рука права або ліва	Перед обробкою		Після обробки		
		10 ⁻⁴ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻³)	10 ⁻⁵ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻⁴)	10 ⁰ (посів 1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)
1	л	66	7	> 330	47	7
	п	181*	25*	165	13	2
2	л	> 330	42	3	0	0
	п	> 330	59	1	0	0
3	л	174*	17*	269*	39*	3
	п	151*	17*	37	5	0
4	л	> 330	46	175*	25*	2
	п	> 330	34	> 330	45	4
5	л	> 330	46	93*	16*	0
	п	> 330	66	71	7	1
6	л	160	13	> 330	106	12
	п	67	6	> 330	47	6
7	л	> 330	50	71	14	1
	п	> 330	50	110	13	0
8	л	130	7	276*	25*	2
	п	148	12	85	11	0
9	л	78	13	260*	35*	7
	п	134	9	> 330	40	3
10	л	200*	21*	148*	25*	4
	п	38	6	189*	23*	3
11	л	151*	17*	5	0	0
	п	147	9	3	0	0
12	л	124*	17*	> 330	117	8
	п	163	13	> 330	40	5
13	л	9	0	77	10	0
	п	10	0	30	6	2
14	л	133*	18*	64	12	0
	п	163	10	12	2	0
15	л	> 330	38	14	1	1
	п	268*	18*	> 330	63	0

Підкреслене = значення, яке враховується при подальших підрахунках
 * = використовуються значимі середні

Продовження додатку 31

Таблиця 6. Процедура обробки рук засобом – експериментальні дані

Засіб: XX

Застосування (засіб для обробки рук): втирати 3,0 см³/30 с, повторити ще раз

Дата експерименту: 24.10.2007

Тест-мікроорганізм: E. coli K 12 NCTC 10538

Суспензія: 2,14 · 10⁸ КУО/см³

Піддослідні особи		Кількість КУО на чашці з розбавлення 10 ^x				
№ п/п	Рука права або ліва	Перед обробкою		Після обробки		
		10 ⁻⁴ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻³)	10 ⁻⁵ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻⁴)	10 ⁰ (посів 1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)
1	л	> 330	60	> 330	40	2
	п	> 330	33	69	14	1
2	л	230*	30*	17	0	0
	п	290*	42*	8	0	0
3	л	22	2	118	14	1
	п	27	3	90	8	0
4	л	279*	25*	> 330	40	1
	п	126*	22*	> 330	107	14
5	л	260*	23*	126*	28*	4
	п	214*	20*	166*	23*	2
6	л	137	13	95	12	1
	п	95	10	165*	18*	1
7	л	140*	20*	216*	28*	4
	п	150*	25*	180*	22*	2
8	л	292	29*	> 330	35	4
	п	> 330	55	278*	25*	1
9	л	238*	29*	> 330	113*	18*
	п	> 330	69	н.п.	245*	20*
10	л	> 330	81	> 330	85	8
	п	> 330	75	> 330	86	14
11	л	> 330	80	53	8	1
	п	> 330	45	37	4	0
12	л	174*	22*	> 330	144	15*
	п	171*	16*	н.п.	> 330	46
13	л	47	4	200*	34*	0
	п	56	4	205*	42*	4
14	л	133	14	211*	21*	4
	п	149*	19*	154	14	1
15	л	> 330	31	41	4	0
	п	189*	26*	> 330	39	6

Підкреслене = значення, яке враховуються при подальших підрахунках
 * = використовують значимі середні
 н.п. = неможливо підрахувати

Таблиця 7. Перелік підрахованих значень lg (середні для лівої і правої руки) та lg редукції (згідно таблиць 5 і 6 цього додатку)

Піддослідні особи № п/п	Еталонна процедура обробки рук (ЕП) 60,0 % 2-пропанол			Процедура обробки рук засобом (ДП)		
	lg N	lg N _{ЕП}	lg R	lg N	lg Na	lg R
1	6,05	2,45	3,60	6,65	2,22	4,43
2	6,70	0,24	6,46	6,43	1,07	5,36
3	6,21	2,01	4,20	5,39	2,01	3,38
4	6,60	2,46	4,14	6,29	2,82	3,47
5	6,74	1,93	4,81	6,37	2,20	4,17
6	6,02	2,85	3,17	6,06	2,10	3,96
7	6,70	1,95	4,75	6,18	2,31	3,87
8	6,14	2,19	3,95	6,61	2,49	4,12
9	6,01	2,52	3,49	6,62	3,23	3,39
10	5,94	2,25	3,69	6,90	2,94	3,96
11	6,18	0,59	5,59	6,78	1,65	5,13
12	6,16	2,84	3,32	6,24	3,41	2,83
13	4,98	1,69	3,29	5,71	2,34	3,37
14	6,18	1,45	4,73	6,15	2,26	3,89
15	6,39	1,97	4,42	6,39	2,10	4,29
—	6,20	1,94	4,24	6,32	2,34	3,98
X	0,43	0,74	0,92	0,40	0,59	0,67
s	15	15	15	15	15	15
n						

— X = загальні середні lg N, lg N_{ЕП}, lg Na та R
 s = стандартне відхилення
 n = кількість значень в кожній колонці

Таблиця 8. Статистичне порівняння значень, отриманих для ЕП та ДП (тест Вілкоксона)

Піддослідні особи № п/п	lg R отриманий з		Різниця (lg) ЕП - ДП	Ряд різниць	
	ЕП	ДП		без знака	зі знаком
1	3,60	4,43	- 0,83	12	- 12
2	6,46	5,36	1,10	15	+ 15
3	4,20	3,38	0,82	11	+ 11
4	4,14	3,47	0,67	9	+ 9
5	4,81	4,17	0,64	8	+ 8
6	3,17	3,96	- 0,79	10	- 10
7	4,75	3,87	0,88	14	+ 14
8	3,95	4,12	- 0,17	4	- 4
9	3,49	3,39	0,10	2	+ 2
10	3,69	3,96	- 0,27	5	- 5
11	5,59	5,13	0,46	6	+ 6
12	3,32	2,83	0,49	7	+ 7
13	3,29	3,37	- 0,08	1	- 1
14	4,73	3,89	0,84	13	+ 13
15	4,42	4,29	0,13	3	+ 3
R = редукція					
Сума рядів (+) : 88					
Сума рядів (-): 32					

Порівняти меншу суму рядів (тут 32) з табличними значеннями з таблиці Вілкоксона (згідно таблиці 9 цього додатку) для $n = 15$ при рівні значимості $p = 0,1$ ($= 36$).

Якщо підрахована менша сума рядів (тут 32) ≤ 36 , ДП значно менш ефективне ніж ЕП.

Таблиця 9. Тест Вілкоксона:
критичні значення менших обох сум рядів зі знаками (+) або (-) при різних рівнях значимості

n (кількість пар з різницею $\neq 0$)	Рівень значимості			
	0,1	0,05	0,01	0,001
12	12	17	9	2
13	26	21	12	4
14	31	25	15	6
15	36	30	19	8

Різниця є достовірною при визначеному рівні, якщо підраховане значення дорівнює табличному значенню або менше нього.

Додаток 32
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності, якості
(ефективності) дезінфекційних засобів та їх
випробування на практиці (пункт 11 розділу II)

Приклади наведення результатів та оцінки їх значимості для засобів хірургічної
обробки рук

Таблиця 1. Еталонна процедура хірургічної обробки рук – експериментальні дані

Еталон: 60,0 % 1-пропанол
Застосування: втирати 3 хв
Дата експерименту: 15.03.2007/22.03.2007

Піддослідні особи		Кількість КУО/чашку з розбавлення 10 ^x								
№ п/п	Рука (права або ліва)	Перед обробкою			Після обробки					
		10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)	10 ⁻³ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻²)	Миттєва дія			«3 год»		
					10 ⁰ (посів 1,0 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)	10 ⁰ (посів 1,0 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻¹ (посів 0,1 см ³ з 10 ⁰)	10 ⁻² (посів 0,1 см ³ з 10 ⁻¹)
1	Л	с.р.	с.р.	127	296*	28*	3			
	П	с.р.	с.р.	510				с.р.	400	39
2	Л	с.р.	380	44				с.р.	205	11
	П	с.р.	900	116	700	89*	16*			
3	Л	с.р.	164*	19*	86	5	2			
	П	с.р.	400	41				с.р.	500	71
4	Л	450	42	10				173*	26*	0
	П	138	10	0	118	13	1			
5	Л	с.р.	350	43	с.р.	276*	20*			
	П	с.р.	600	61				с.р.	500	64
6	Л	500	58	5				47	5	0
	П	259*	20*	1	3	0	0			
7	Л	с.р.	156	14	38	3	0			
	П	800	108	6				18	2	0
8	Л	с.р.	141	13	500	66	5			
	П	с.р.	500	56				с.р.	259*	19*
9	Л	с.р.	315	28				800	119	12
	П	450	33	5	0	0	0			
10	Л	с.р.	700	114	54	2	0			
	П	с.р.	480	40				с.р.	77	6
11	Л	350	41	1				2	0	0
	П	700	89	4	0	0	0			
12	Л	121	10	0	132*	21*	3			
	П	331	39	2				с.р.	175*	23*
13	Л	375	32	1				с.р.	262*	16*
	П	335	36	5	5	1	0			
14	Л	318	29	3				178*	23*	1
	П	27	8	1	0	0	0			
15	Л	с.р.	800	28	42	5	0			
	П	с.р.	600	192				с.р.	500	65
16	Л	с.р.	с.р.	321				с.р.	101	7
	П	с.р.	с.р.	412	78	4	0			
17	Л	с.р.	с.р.	253	с.р.	550	81			
	П	с.р.	800	87				с.р.	750	62
18	Л	с.р.	650	64				600	67	5
	П	с.р.	с.р.	121	с.р.	224*	21*			
19	Л	с.р.	600	72	0	0	0			
	П	с.р.	350	40				31	6	0
20	Л	350	43	2				500	52	3
	П	800	114	10	27	1	0			

Підкреслене – значення, які використовують для подальшого підрахунку

С.р. – суцільний ріст

* – використовують значимі середні

Таблиця 2. Процедура хірургічної обробки рук засобом – експериментальні дані

Засіб: П
 Застосування: витрати 3 хв
 Дата експерименту: 15.03.2007/22.03.2007

Піддослідні особи		Кількість КУО/чашку з розбавлення 10^x								
№	Рука (права або ліва)	Перед обробкою			Після обробки					
		10^{-1} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^0)	10^{-2} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^{-1})	10^{-3} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^{-2})	Миттєва дія			«3 год»		
					10^0 (посів $1,0 \text{ см}^3$ з 10^0)	10^{-1} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^0)	10^{-2} (посів $0,1$ см^3 з 10^{-1})	10^0 (посів $1,0$ см^3 з 10^0)	10^{-1} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^0)	10^{-2} (посів $0,1 \text{ см}^3$ з 10^{-1})
1	Л	с.р.	590	81	208*	21*	0			
	П	с.р.	500	98				с.р.	800	95
2	Л	с.р.	300*	32*				с.р.	360	28
	П	с.р.	283*	23*	11	0	0			
3	Л	с.р.	185	13	9	0	0			
	П	с.р.	105	8				350	36	4
4	Л	500	68	6				113	14	0
	П	300	13	2	13	3	0			
5	Л	с.р.	326	39	800	118	12			
	П	с.р.	239*	18*				с.р.	365	39
6	Л	с.р.	332	48				с.р.	172*	17*
	П	500	48	6	168*	48*	3			
7	Л	368	41	3	194*	19*	2			
	П	850	93	9				с.р.	239*	20*
8	Л	с.р.	198*	21*	186*	38*	1			
	П	с.р.	272*	63*				с.р.	226*	21*
9	Л	168	12	1				28	2	0
	П	138*	16*	1	1	0	0			
10	Л	с.р.	472	41	42	2	0			
	П	с.р.	500	58				с.р.	с.р.	378
11	Л	с.р.	317	28				0	0	0
	П	с.р.	320	41	11	1	0			
12	Л	с.р.	67	8	254*	15*	2			
	П	с.р.	234*	19*				с.р.	321	32
13	Л	700	62	6				600	51	6
	П	550	61	6	6	0	0			
14	Л	222*	22*	2				с.р.	101	13
	П	55	2	0	4	1	0			
15	Л	с.р.	131	10	14	1	0			
	П	500	51	6				с.р.	350	35
16	Л	с.р.	с.р.	198				650	88	8
	П	с.р.	с.р.	204	900	133	13			
17	Л	с.р.	166	13	700	66	6			
	П	с.р.	500	70				с.р.	350	51
18	Л	с.р.	800	85				320	34	3
	П	с.р.	305	24	166*	17*	2			
19	Л	с.р.	с.р.	136	45	8	0			
	П	с.р.	800	74				с.р.	229*	24*
20	Л	232*	26*	3				33	6	1
	П	с.р.	294*	25*	с.р.	139	13			

Підкреслене – значення, які використовують для подальшого підрахунку

С.р. – суцільний ріст

* – використовують значимі середні

Таблиця 3. Перелік підрахованих значень $\lg$ та $\lg$ редукції

Засіб: еталонний 60,0 % 1-пропанол

Застосування: втирати 3 хв

Піддослідні особи № п/п	Миттєва дія			«3 год»		
	$\lg x$	$\lg y$	$\lg z$	$\lg x$	$\lg y$	$\lg z$
1	5,10	2,47	2,63	5,71	3,59	2,12
2	5,06	2,98	2,08	4,64	3,31	1,33
3	4,22	1,93	2,29	4,61	3,85	0,76
4	3,14	2,07	1,07	3,62	2,26	1,36
5	4,63	3,43	1,20	4,79	3,81	0,98
6	3,40	0,48	2,92	3,76	1,67	2,09
7	4,19	1,58	2,61	4,03	1,26	2,77
8	4,15	2,82	1,33	4,75	3,40	1,35
9	3,52	0,00	3,52	4,45	3,08	1,37
10	5,06	1,73	3,33	4,60	2,89	1,71
11	3,95	0,00	3,95	3,61	0,30	3,31
12	3,08	2,14	0,94	3,59	3,26	0,33
13	3,56	0,70	2,86	3,51	3,40	0,11
14	2,43	0,00	2,43	3,46	2,26	1,20
15	4,45	1,62	2,83	5,28	3,81	1,47
16	5,61	1,89	3,72	5,51	3,00	2,51
17	5,40	3,91	1,49	4,94	3,79	1,15
18	5,08	3,35	1,73	4,81	2,83	1,98
19	4,86	0,00	4,86	4,60	1,49	3,11
20	4,06	1,43	2,63	3,63	2,72	0,91
x	4,25	1,73	2,52	4,40	2,80	1,60
s	0,87	1,23	1,04	0,70	0,98	0,86
N	20	20	20	20	20	20

$\lg x$ – $\lg$ перед обробкою
 $\lg y$ – $\lg$ після обробки
 $\lg z$ – $\lg$ редукції
x – загальне середнє $\lg x$, $\lg y$ та $\lg z$
s – стандартне відхилення
N – кількість значень в кожній колонці

Таблиця 4. Перелік підрахованих значень $\lg$ та $\lg$ редукції

Засіб:

П

Застосування:

втррати 3 хв

Піддослідні особи	Миттєва дія			«3 год»		
	$\lg x$	$\lg y$	$\lg z$	$\lg x$	$\lg y$	$\lg z$
1	4,91	2,32	2,59	4,99	3,98	1,01
2	4,44	1,04	3,40	4,48	3,45	1,03
3	4,27	0,95	3,32	4,02	2,56	1,46
4	3,48	1,11	2,37	3,83	2,05	1,78
5	4,59	3,07	1,52	4,37	3,59	0,79
6	3,68	2,29	1,39	4,68	3,24	1,44
7	3,61	2,29	1,32	3,97	3,37	0,60
8	4,30	2,31	1,99	4,48	3,35	1,13
9	3,15	0,00	3,15	3,23	1,45	1,78
10	4,61	1,62	2,99	4,76	4,58	0,18
11	4,61	1,04	3,57	4,45	0,00	4,45
12	3,83	2,39	1,44	4,36	3,51	0,86
13	3,79	0,78	3,01	3,79	2,71	1,08
14	2,74	0,60	2,14	3,35	3,00	0,35
15	4,12	1,15	2,97	3,71	3,54	0,17
16	5,31	3,12	2,19	5,30	2,94	2,36
17	4,22	2,82	1,40	4,85	3,71	1,14
18	4,38	2,22	2,16	4,93	2,53	2,40
19	5,13	1,65	3,48	4,87	3,36	1,51
20	4,46	3,14	1,32	3,37	1,52	1,85
x	4,18	1,80	2,39	4,29	2,92	1,37
s	0,65	0,93	0,81	0,60	1,04	0,96
N	20	20	20	20	20	20

$\lg x$ – $\lg$ перед обробкою
 $\lg y$ – $\lg$ після обробки
 $\lg z$ – $\lg$ редукції
 x – загальне середнє $\lg x$, $\lg y$ та $\lg z$
 s – стандартне відхилення
 N – кількість значень в кожній колонці

Таблиця 5. Статистичне порівняння значень, отриманих для ЕП та ДП
(тест Вілкоксона)

Миттєва дія

Піддослідні особи № п/п	lg R отриманий з		Різниця (lg) ЕП - ДП	Ряд різниць	
	ЕП	ДП		без знака	зі знаком
1	2,63	2,59	0,04	1	1
2	2,08	3,40	-1,32	17	-17
3	2,29	3,32	-1,03	13	-13
4	1,07	2,37	-1,30	15	-15
5	1,20	1,52	-0,32	6	-6
6	2,92	1,39	1,53	19,5	19,5
7	2,61	1,32	1,29	14	14
8	1,33	1,99	-0,66	12	-12
9	3,52	3,15	0,37	8	8
10	3,33	2,99	0,34	7	7
11	3,95	3,57	0,38	9	9
12	0,94	1,44	-0,50	11	-11
13	2,86	3,01	-0,15	4	-4
14	2,43	2,14	0,29	5	5
15	2,83	2,97	-0,14	3	-3
16	3,72	2,19	1,53	19,5	19,5
17	1,49	1,40	0,09	2	2
18	1,73	2,16	-0,43	10	-10
19	4,86	3,48	1,38	18	18
20	2,63	1,32	1,31	16	16
R = редукція					
Сума рядів (+) : 119					
Сума рядів (-): 91					

Табличне значення для нижчої межі ряду сум в тесті Вілкоксона – це 69 при використанні одностороннього методу при $p = 0,1$.

Так як підрахована нижча сума рядів не буде нижче цього рівня, то різниця середніх lg редукції ЕП та ДП вважається не значимою.

Продовження додатку 32

Таблиця 6. Статистичне порівняння значень, отриманих для ЕП та ДП
(тест Вілкоксона)

Дія «3 год»

Піддослідні особи № п/п	lg R отриманий з		Різниця (lg) ЕП - ДП	Ряд різниць	
	ЕП	ДП		без знака	зі знаком
1	2,12	1,01	1,11	15	15
2	1,33	1,03	0,30	5	5
3	0,76	1,46	-0,70	11	-11
4	1,36	1,78	-0,42	7,5	-7,5
5	0,98	0,79	0,19	3	3
6	2,09	1,44	0,65	10	10
7	2,77	0,60	2,17	20	20
8	1,35	1,13	0,22	4	4
9	1,37	1,78	-0,41	6	-6
10	1,71	0,18	1,53	18	18
11	3,31	4,45	-1,14	16	-16
12	0,33	0,86	-0,53	9	-9
13	0,11	1,08	-0,97	14	-14
14	1,20	0,35	0,85	12	12
15	1,47	0,17	1,30	17	17
16	2,51	2,36	0,15	2	2
17	1,15	1,14	0,01	1	1
18	1,98	2,40	-0,42	7,5	-7,5
19	3,11	1,51	1,60	19	19
20	0,91	1,85	-0,94	13	-13
R = редукція					
Сума рядів (+) : 126					
Сума рядів (-): 84					

Табличне значення для нижчої межі ряду сум в тесті Вілкоксона – це 37 при використанні двохстороннього методу при $p = 0,01$.

Так як підрахована нижча сума рядів не буде нижче цього рівня, то різниця середніх lg редукції ЕП та ДП вважається не значимою.

Продовження додатку 32

Таблиця 7. Оцінка ДП (порівняння середніх значень lg редукцій, отриманих для ДП та ЕП)

Оцінена дія	Середнє значення lg редукції		Достовірність різниці
	ДП	ЕП	
Миттєва дія	2,39	2,52	Н.д. ($p>0,1$)
«3 год» дія	1,37	1,60	Н.д. ($p>0,01$)
Н.д. – не достовірна			

Заключення: згідно вимог засіб П підходить для хірургічної обробки рук наступним чином: втирати в руки таку кількість об'ємів по $3,0 \text{ см}^3$, скільки вимагається для підтримання рук вологими протягом 3 хв.

Засіб П також було досліджено на наявність пролонгованої дії, оскільки було заявлено цю властивість. Але результати дослідження показали, що порівняно з 1-пропанолом засіб П має миттєву дію, але не пролонговану. Виходячи з цього, засіб П підходить для хірургічної обробки рук, але без додаткової властивості пролонгованої активності.

Таблиця 8 Тест Вілкоксона критичні значення для нижчих обох сум рядів зі знаком «+» або «-» при різних рівнях достовірності

n кількість пар з різницею $\neq 0$	Рівень достовірності		
	0,1	0,01	
	односторонній	односторонній	двосторонній
18	55	32	27
19	62	37	32
20	69	43	37

Додаток 33

до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.2. пункту 3 розділу IV)

Тест-віруси і методи їх культивування

1. Тест-віруси

Тест-віруси отримують з національних або з міжнародних колекцій вірусів:

1.1. Вірус поліомієліту 1 типу (вакцинний штам Sabin (LSc-2ab), РНК-вмісткий вірус, який не має оболонки, з сімейства пікорнавірусів.

1.2. Аденовірус, тип 5, штам аденоїди 75 (ATCC VR-5), ДНК – вмісткий вірус, що не має оболонки, з сімейства аденовірусів.

2. Культивування вірусів

2.1. Вихідний вірус - це вірус, отриманий з референс центрів (з національних або міжнародних колекцій вірусів), розмножений в обсягах, достатніх для тривалої роботи з даними пасажем, при мінімальних кількостях пасажів. Зберігається в малих обсягах при - 70⁰С або в рідкому азоті (Керівництво з вирусологичних досліджень поліомієліту, ВООЗ, Женева, М., 1998).

2.2. Тест-вірусна суспензія - вірусна суспензія, отримана з вихідного вірусу і використовується для визначення віруліцидності властивостей дезінфектанту.

2.3. Вихідний вірус розмножують в чутливих клітинах, які продукують вірус у високих титрах. Клітинний детрит видаляють центрифугуванням при низьких обертах (1000 об/хв). Цей матеріал називають «тест-вірусною суспензією». Її використовують не розведеною. Передбачається, що мінімальний титр вірусної суспензії принаймні 10^{6,5} ТЦІД₅₀/мл. У будь-якому випадку він повинен бути досить високим, щоб можна було отримати зниження титру на 4,0 log₁₀.

Поліовірус розмножують в перещеплюваної культурі клітин RD і HEp-2 або в інших чутливих клітинних культурах (4647, Vero і т.д.). Для отримання вірусу культуру клітин, інфіковану вірусом поліомієліту на стадії 100% ураження моношару, викликаного цитопатичною дією вірусу, триразово заморожують і розморожують. Після видалення зруйнованих клітин центрифугуванням, отриману суспензію використовують в експериментах.

Аденовірус розмножують в перещеплюваної клітинній культурі HEp-2, 4647 і в інших чутливих клітинних культурах. Методика отримання вірусу аналогічна вищеописаній, за винятком того, що перед процедурою руйнування клітин методом заморожування-розморожування, проводять заміну культурального середовища на те, що не містить сироватки і додають її в меншому обсязі.

Додаток 34

до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.2. пункту 3 розділу IV)

СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначення 50% дози за методом Рида і Менча

Метод викладений: Reed LJ, Muench HA A simple method of estimating 50% endpoints. Am. J. Hyd., 1938, 27, 493 - 497.

Титрування вірусу в пробіркових культурах передбачає визначення дози, при якій дія вірусу (цитопатична дія) проявляється в 50% тест-об'єктів (пробіркових культур), так званих ТЦІД₅₀. Оскільки в більшості випадків за даними титрування відразу не вдається визначити 50% дозу, виникає необхідність в статистичній обробці результатів. Результати можуть вважатися статистично достовірними при дотриманні наступних умов:

1. Кількість тест-об'єктів, заражених одним розведенням вірусу, має бути не менше 4;
2. Для титрування беруть два розведення вірусу нижче 50% дози і два розведення вірусу вище цієї дози.

Метод заснований на логічній передумові, що тканинна культура або тварина, загиблі при зараженні їх яким-небудь розведенням вірусу, загинуть і при зараженні будь-яким нижчим розведенням.

Приклад підрахунку показаний в таблиці 1.

Підрахунок 50 % дози (ТЦІД₅₀) за методом Рида і Менча

Розведення вірусу	Кількість тест-об'єктів	Вихідні дані		Кумулятивні дані		Відсоток розведення
		загинуло	вижило	загинуло	вижило	
10 ⁻⁵	4	4	0	7	0	100
10 ⁻⁶	4	2	2	3	2	60
10 ⁻⁷	4	1	3	1	5	17
10 ⁻⁸	4	0	4	0	9	0

З вищенаведеної таблиці видно, що 50% доза знаходиться між розведеннями вірусу 10⁻⁶ і 10⁻⁷.

Далі розрахунок величини X, яку необхідно додати до розведення безпосередньо нижче 50% дози (в log₁₀), проводиться за формулою:

$$X = \frac{A-50}{A-B},$$

де: А - відсоток загибелі при розведенні, безпосередньо нижче шуканої 50% дози (в даному випадку 60%);

В - відсоток загибелі при розведенні безпосередньо вище шуканої 50% дози (в даному випадку 17%).

Підставляючи отримані значення в формулу 1, знаходимо:

$$X = \frac{60 - 50}{60 - 17} = 0,23,$$

звідки титр вірусу (в зворотних $\log_{10}$) дорівнює $6 + 0,23 = 6,23$; іншими словами, одна ТЦІД₅₀ відповідає розведенню вірусу $10^{-6,23}$.

Якщо в титрування були взяті розведення вірусу з інтервалом $0,5 \log_{10}$, то величину X у формулі 1 слід помножити на 0,5.

Оскільки при титруванні вірусу в пробіркових культурах зазвичай виходять чіткі результати і культури зі 100% дегенерацією, відокремлені від культур з повною відсутністю дегенерації всього одним розведенням вірусу, зручно користуватися при підрахунку титрів по Ріду і Менчу спрощеною схемою:

Кількість пробірочних культур, заражених розведенням 10^{-n}	- Кількість культур з ЦПД	Відсоток культур з ЦПД	Титр вірусу в $\log_{10}$
4	1	25	(n-1), 66
4	2	50	n, 0
4	3	75	n, 33
4	4	100	n, 50

Для обчислення ТЦІД₅₀ (кількості цитопатогенних доз) вірусу в 1 мл досліджуваної рідини до показника величини титру вірусу в $\log_{10}$ додають в залежності від кількості вірусмісткого матеріалу, взятого для зараження однієї культури, відповідні величини поправок:

Об'єм матеріалу в мілілітрах, взятого для зараження однієї культури	Величина поправки в одиницях логарифма
0,2	0,7
0,25	0,6
0,3	0,52
0,4	0,4
0,5	0,3
0,6	0,22
0,7	0,16
0,8	0,1

Наприклад, якщо у всіх пробіркових культурах, заражених по 0,2 мл матеріалом в розведенні 10^{-4} , спостерігається цитопатогенний ефект, а в культурах, інокульованих розведенням 10^{-6} , цитопатогенного ефекту не спостерігається (при інокуляції ж розведенням 10^{-5} цитопатогенний ефект відзначений в одній з чотирьох пробірок), то титр вірусу в $\log_{10}$ буде дорівнювати $10^{4,66}$. А зміст його в 1 мл дорівнюватиме $10^{5,36}$ ТЦІД₅₀.

Додаток 35
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.2. пункту 3 розділу IV)

Класифікація дезінфекційних засобів та їх діючих речовин за ступенем
небезпечності

1.1. Дезінфекційні засоби підрозділяються на чотири класи небезпечності:

- I - надзвичайно небезпечні;
- II - небезпечні;
- III - помірно небезпечні;
- IV - малонебезпечні.

1.2. Клас небезпечності дезінфекційних засобів встановлюється в залежності від показників, зазначених у нижченаведеній таблиці.

1.3. Віднесення дезінфекційного засобу до конкретного класу небезпечності ґрунтується на принципі комплексної оцінки властивостей з урахуванням лімітуючого критерію шкідливості, тобто оцінка здійснюється за критерієм, який визначає найбільшу небезпеку дезінфекційного для здоров'я людини.

1.4 Клас небезпечності дезінфекційного засобу

1.5. Класифікації підлягають діюча речовина та її препаративні форми.

Якщо препаративна форма відрізняється за ступенем небезпечності від діючої речовини, вона може бути віднесена до іншого класу небезпечності. Враховують особливості препаративної форми (летючість, можливість виділення пилу, та ін.).

Таблиця

Класифікація дезінфекційних засобів за ступенем небезпечності

Критерії небезпечності *	Класи небезпечності			
	1	2	3	4
1	2	3	4	5
Середня смертельна доза при введенні в шлунок, мг/кг				
тверді форми засобу	менше 15	15-50	51-500	більше 500
рідкі форми засобу	менше 50	50-200	201-2000	більше 2000
Середня смертельна доза при нанесенні на шкіру, мг/кг				

Продовження таблиці

тверді форми засобу	менше 10	10-100	101-1000	більше 1000
рідкі форми засобу	менше 40	41-400	401-4000	більше 4000
Середня смертельна концентрація в повітрі робочої зони, мг/м ³	менше 500	500-5000	5001-50000	більше 50000
Коефіцієнт можливості інгаляційного отруєння	більше 10	10-2,1	2,0-0,5	менше 0,5
Коефіцієнт кумуляції	менше 1	1-3	3,1-5	більше 5
Подразнююча дія	Сильний подразник	Помірний подразник	Слабкий подразник	Подразнююча дія не виявлена
Алергенність	Сильний алерген	Помірний алерген	Слабкий алерген	Алергенна дія не виявлена
Мутагенність	Індукує генні і хромосомні мутації у всіх тест-об'єктів, тому числі ссавців in vivo	Індукує генні і хромосомні мутації у окремих тест-об'єктів, за винятком ссавців in vivo	Індукує або генні, або хромосомні мутації у обмеженого кола тест-об'єктів - нессавців	Порушення у структур та функції генетичного апарату не можна кваліфікувати як мутації
Канцерогенність	Канцероген для людини	Ймовірний канцероген для людини	Малоймовірний канцероген для людини	Канцерогенність не встановлена
Тератогенність	Доведено тератогенність для людини	Сильний тератоген для тварин	Слабкий тератоген для тварин	Ефект не спостерігається.
Ембріотоксичність	Ефект на людях обліку не підлягає	Сильний ефект при дії доз не токсичних для самок	Слабкий ефект. Спостерігається поряд з іншими токсичними ефектами	Ефект не спостерігається
Репродуктивна токсичність	Виражена	Помірна	Слабка	Репродуктивна токсичність відсутня

Додаток 36
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(підпункт 3.2. пункту 3 розділу IV)

Таблиця

Методи оцінки токсичності діючих речовин дезінфекційних засобів

№	Показники	Методи, що використовуються
1	Гостра пероральна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 420, 423, 425
2	Гостра дермальна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 402
3	Гостра інгаляційна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 403, 436
4	Подразнююча дія на шкіру	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 404, 431, 439
5	Подразнююча дія на слизові оболонки очей	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 405, 492
6	Сенсибілізуюча дія	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 406
7*	28-добове дослідження пероральної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 407
8	90-добове дослідження пероральної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 408
9*	21/28-добове дослідження дермальної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 410
10*	90-добове дослідження дермальної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 411
11	Хронічна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 452
12	Комбіноване дослідження хронічної токсичності / канцерогенності	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 453
13*	Дослідження нейротоксичності на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 424, 426
14*	Віддалена нейротоксичність фосфор-органічних речовин після гострого впливу	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 418
15*	Віддалена нейротоксичність фосфор-органічних речовин: 29-добове дослідження повторних доз	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 419
16	Тератогенна активність та ембріотоксичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 414
17	Репродуктивна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 416, 421, 443
18	Канцерогенна токсичність на щурах і мишах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 451

Продовження таблиці

19	Мутагенна активність: Тест зворотної мутації бактерій (тест Еймса) Тест хромосомних аберацій на клітинах кісткового мізку ссавців <i>In Vivo</i> <i>In Vivo</i> тест на індукцію мікроядер в клітинах ссавців <i>In Vivo</i> тест хромосомних аберацій ссавців <i>In Vivo</i> тест на індукцію мікроядер в клітинах ссавців <i>In Vivo</i> <i>Комет</i> -тест в клітинах ссавців	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 471 OECD Guideline for Testing of Chemicals № 475 OECD Guideline for Testing of Chemicals № 474 OECD Guideline for Testing of Chemicals № 473 OECD Guideline for Testing of Chemicals № 487 OECD Guideline for Testing of Chemicals № 489
20	Токсикокінетика	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 417
21	Дослідження генотоксичності, канцерогенності та токсичної дії на репродуктивну функцію	ISO 10993-3:2014 Biological evaluation of medical devices- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
22	Проби на подразнення та алергійну реакцію шкіри	ISO 10993-10:2010 Biological evaluation of medical devices- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization
23	Дослідження загальнотоксичної дії	ISO 10993-11:2017 Biological evaluation of medical devices- Part 11: Tests for systemic toxicity
24	Принципи та методи досліджень імунотоксичності медичних виробів	ISO/TS 10993-20:2006 Biological evaluation of medical devices- Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices
25	Дослідження на цитотоксичність: методи <i>in vitro</i>	ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

*- за необхідністю, у випадку фосфорорганічних сполук

Додаток 37
до Методів проведення досліджень
специфічної активності, безпечності,
якості (ефективності) дезінфекційних
засобів та їх випробування на практиці
(пункт 4 розділу VI)

Методи оцінки токсичності препаративних форм дезінфекційних
засобів

№	Показники	Методи досліджень
1	Гостра пероральна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 420, 423, 425
2	Гостра дермальна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 402
3	Гостра інгаляційна токсичність	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 403, 436
4	Подразнююча дія на шкіру	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 404, 431, 439
5	Подразнююча дія на слизові оболонки очей	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 405, 492
6	Сенсибілізуюча дія	OECD Guideline for Testing of Chemicals №№ 406
7	28-добове дослідження пероральної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 407
8	90-добове дослідження пероральної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 408
9*	21/28-добове дослідження дермальної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 410
10*	90-добове дослідження дермальної токсичності повторних доз на гризунах	OECD Guideline for Testing of Chemicals № 411

*- у випадку вираженої шкірно-резорбтивної дії та/або високої дермальної токсичності