

A microscopic view of various bacteria and viruses, rendered in a blue and white color scheme. The background is a gradient of light blue to white. In the center, there is a large, complex, star-shaped virus with many protruding arms. Surrounding it are various other microorganisms, including rod-shaped bacteria, spherical bacteria, and larger, more complex structures. The overall appearance is that of a dense population of diverse microbial life.

# **Подтверждение антимикробной эффективности дезинфицирующих средств**

**Чернявская Ася Анатольевна**

**Заместитель генерального директора испытательной лаборатории «Микробиолог»**

**Москва  
2021**

# Методы оценки антимикробной эффективности дезинфицирующих средств приведены в документах

- ✓ ГОСТ Р 58151.4-2018 «Средства дезинфицирующие. Методы определения показателей эффективности»,
- ✓ Р 4.2.3676-20 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки эффективности и безопасности»,
- ✓ МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях»,
- ✓ EN 13697 «Химические дезинфектанты и антисептики. Количественный тест на непористой поверхности для оценки бактерицидного и/или фунгицидного действия химических дезинфектантов, используемых в пищевых, промышленных, домашних и институциональных помещениях. Метод тестирования без механического воздействия»,
- ✓ USP <1072> «Дезинфектанты и антисептики»

# МЕТОДОЛОГИЯ

<b>Р 4.2.3676-20</b>	<b>ГОСТ Р 58151.4-2018 Р 4.2.3676-20</b>	<b>МУ 3.5.1.3439-17</b>	<b>EN 13697:2015</b>
Суспензионный метод	Поверхностный метод	Поверхностный метод	Поверхностный метод

- ✓ Рабочие растворы ДС готовят непосредственно перед проведением исследований. При изучении ДС, производимых в форме гранул, порошков, таблеток и т.п., рабочие растворы используют только после полного растворения дезинфицирующего средства (если не указано на возможность выпадения осадка).
- ✓ При определении антимикробной эффективности ДС в качестве тест-микроорганизмов используют тест-микроорганизмы, представленные в руководящем документе, где описан метод испытания. Возможно применение тест-микроорганизмов, представленных в ГФ XIV. Необходимо использование музейных культур, полученных при проведении микробиологического мониторинга производственной среды.

# ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕЙ СУСПЕНЗИИ ТЕСТ-МИКРООРГАНИЗМОВ:

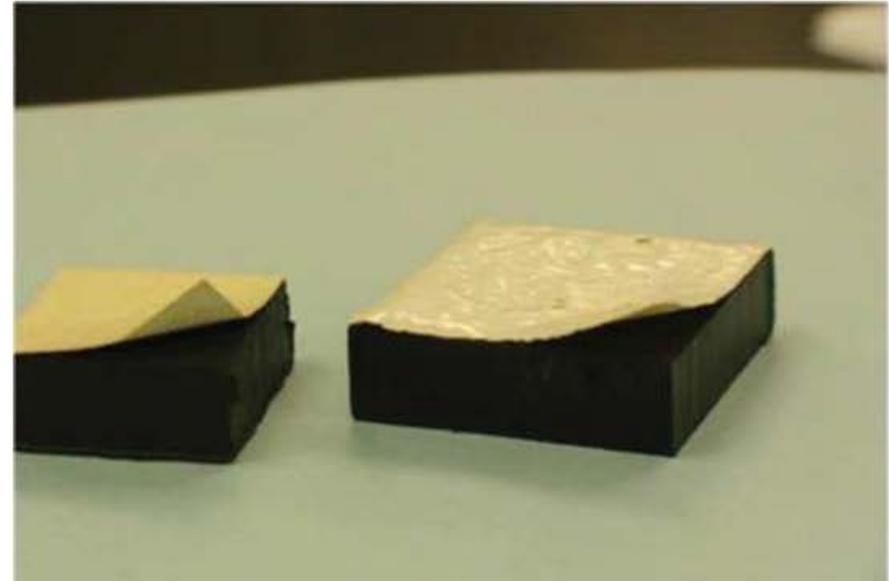
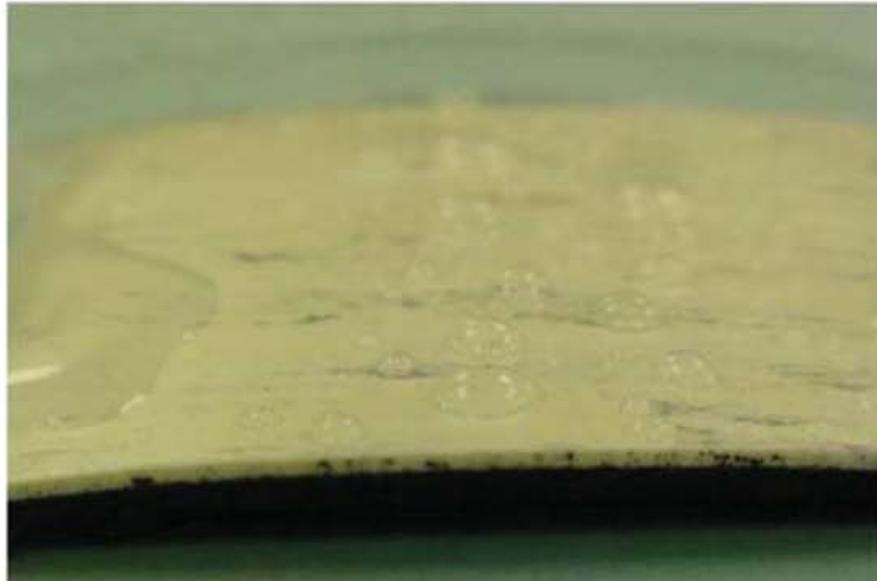
- ✓ Суточные культуры бактерий и дрожжевого гриба *Candida albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида.
- ✓ Используя стандартные образцы мутности 10 МЕ или 20 МЕ или стандарт McFarland готовят взвеси каждого тест-штамма в концентрациях, установленных условиями опыта.
- ✓ Рабочую суспензию *Aspergillus brasiliensis* получают, смывая со скошенной среды для выращивания грибов 5-7 суточную культуру 1 мл фосфатного буферного раствора с 0,05 % твин-80. Отбирают 0,4 мл полученной взвеси и переносят в пробирку, содержащую 4 мл фосфатного буферного раствора с 0,05% твин-80. В полученной таким образом рабочей суспензии *Aspergillus brasiliensis* содержится примерно  $10^6$  конидий/мл.

Эталонные дезинфицирующие средства	Концентрация раствора по ДВ, %	Время гибели тест-микроорганизмов, мин, не менее			
		<i>E. coli</i> , шт. АТСС 10536	<i>S. aureus</i> , шт. АТСС № 6538-Р	<i>P. aeruginosa</i> шт. АТСС 27853	<i>S. typhimurium</i> шт. АТСС 13311
Хлорамин	0,020*	5	–	10	5
	0,200*	–	15	–	–
АДБАХ	0,025	20	10	10	20
Глутаровый альдегид	0,030	10	–	10	10
	0,060	–	10	–	–
Перекись водорода	2,000	10	–	10	10
	3,000	–	25	–	–

# ПОДГОТОВКА ТЕСТИРУЕМЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ

- ✓ Тест-поверхности должны имитировать те объекты, которые будут подвергаться дезинфекции. При подтверждении антимикробной эффективности дезинфицирующих средств рекомендовано использовать не менее 5 видов тест – поверхностей.
- ✓ Тест-поверхности должны быть стойкими к воздействию моющих и дезинфицирующих средств, не обладать антимикробными свойствами.
- ✓ Подготовка тест - поверхностей перед тестированием является важным этапом, влияющим на результат испытания. Перед использованием тест-поверхности необходимо очистить, высушить и простерилизовать.

## Деформация тест-поверхностей после автоклавирования



**Для определения микробоцидного и исключения статического действия ДС по истечении времени экспозиции необходимо прекратить действие ДС на тест-микроорганизм посредством химического нейтрализатора.**

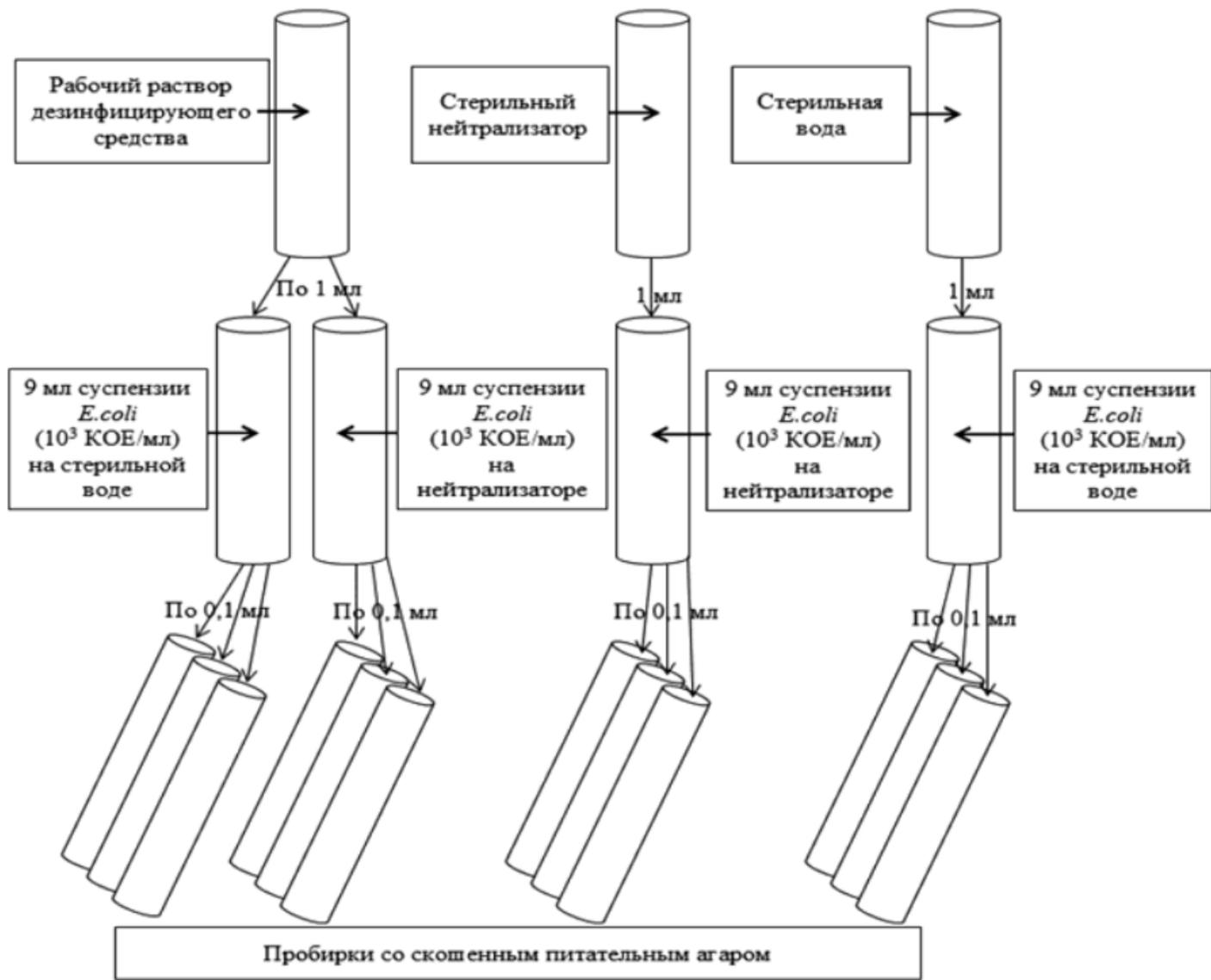
В качестве химических нейтрализаторов применяют:

- ✓ 0,1-1,0% раствор тиосульфата натрия для галоидоактивных (хлор-, бром-, и йодактивные) и кислородактивных (перекись водорода, ее комплексы с солями, надуксусная кислота, озон) дезинфицирующих средств;
- ✓ 0,1-1,0% раствор лаурилсульфат натрия (сульфонол) или раствор лаурилсульфат натрия с 10 % обезжиренного молока или универсальный нейтрализатор для четвертичных аммониевых солей (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилметиламмоний хлорид и др.), производных гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.);
- ✓ 1,0% раствор пиросульфита (метабисульфита) натрия или универсальный нейтрализатор для альдегидов (глутаровый альдегид, глиоксаль, формальдегид, ортофталевый альдегид);
- ✓ щелочи в эквивалентном количестве для кислот;
- ✓ кислоты в эквивалентном количестве для щелочей;
- ✓ для спиртов использовать разведение в воде до недействующей концентрации;
- ✓ универсальный нейтрализатор, содержащий твин-80 (3%), сапонин (0,3-3,0%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%) для композиционных средств. Если в состав композиции входят окислители, в нейтрализатор дополнительно вводят тиосульфат натрия.

Нейтрализатор – вещество (или несколько веществ), которое устраняет (нейтрализует) действие химического средства на микробную клетку, но при этом не вызывает гибель тест-микроорганизма, не задерживает его рост и размножение.

Перед проведением испытаний антимикробной эффективности каждого дезинфицирующего средства должна быть подтверждена эффективность и нетоксичность выбранного нейтрализатора для тест-микроорганизмов, планируемых к использованию. Для контроля используют суспензионный метод.

В целях сокращения времени на подбор оптимального нейтрализатора, а также объективного подтверждения того, что действующие вещества, входящие в состав дезинфицирующего средства, полностью нейтрализованы, используют культуру бактерий, чувствительную к исследуемому действующему веществу, например, тест-штамм *E. coli* или *S. Aureus*.



# ПОВЕРХНОСТНЫЙ МЕТОД (ГОСТ Р 58151.4-2018; Р 4.2.3676-20 )

1. Подготовка тест-поверхностей размером 10 см x 10 см (100 см<sup>2</sup> );
2. Стерилизация тест-поверхностей 76% раствором спирта этилового в течение 15 мин;
3. Нанесение на подготовленные поверхности по 0,5 мл соответствующей суспензии микроорганизмов с концентрацией  $2 \times 10^9$ /мл;
4. Распределение микробной суспензии по тест - поверхности шпателем;
5. Подсушивание поверхностей до полного высыхания и обработка салфеткой, смоченной в растворе ДС или орошением;
6. Для обработки контрольных поверхностей вместо дезинфицирующего раствора использовать стерильную очищенную воду;
7. Выдержка времени воздействия ДС на микроорганизм;
8. Протирка тест-поверхности стерильной марлевой салфеткой размером 5×5 см, смоченной в нейтрализаторе для остановки воздействия ДС на микроорганизм ;
9. Погрузить салфетку в емкость с 10 мл этого же нейтрализатора и стеклянными бусами;
10. Отмывать марлевую салфетку 10 минут при постоянном встряхивании;
11. Посеять отмывную жидкость по 0,1 мл на поверхность соответствующих питательных сред.

## **Оценка результатов:**

Критерий антимикробной эффективности дезинфицирующего средства - процент обеззараживания составляет 99,99 %.

## Оценка результатов

После подсчета количества выросших на чашках Петри колоний рассчитывают плотность контаминации  $n$  см<sup>2</sup> поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100 %.

Процент обеззараживания рассчитывают по следующей формуле:

$$X = 100 - \frac{O}{K} \times 100,$$

где:

$X$  – процент обеззараживания;

$O$  – количество микробных клеток на опытной поверхности;

$K$  – количество микробных клеток на контрольной поверхности.

# ПОВЕРХНОСТНЫЙ МЕТОД (МУ 3.5.1.3439-17)

1. Подготовка тест-поверхностей размером 5 см x 5 см (25 см<sup>2</sup>) в стерильные чашки Петри;
2. Стерилизация тест-поверхностей автоклавированием или фламбированием. При невозможности применения данных методов - 76% раствором спирта этилового в течение 15 мин;
3. Нанесение на подготовленные поверхности по 0,1 мл соответствующей суспензии микроорганизмов с концентрацией  $2 \times 10^9$ /мл;
4. Распределение микробной суспензии по тест - поверхности шпателем;
5. Подсушивание поверхностей до полного высыхания и обработка салфеткой, смоченной в растворе ДС или орошением;
6. Для обработки контрольных поверхностей вместо дезинфицирующего раствора использовать стерильную очищенную воду;
7. Выдержка времени воздействия ДС на микроорганизм;
8. После окончания экспозиции чашки с тест-объектами заливают 10 мл раствора нейтрализатора и делают несколько круговых движений чашкой для лучшего смачивания тест-объекта. Время нейтрализации 10 мин. Затем удаляют тест-объект из чашки;
9. Посев отмывной жидкости по 0,1 мл на поверхность твердых дифференциально-диагностических сред.

## Оценка результатов:

Критерий антимикробной эффективности дезинфицирующего средства – процент обеззараживания составляет 99,99 % и более.

# ПОВЕРХНОСТНЫЙ МЕТОД (EN 13697:2015)

1. Подготовка тест-поверхностей (диски из нержавеющей стали) диаметром 2 см;
2. Подготовка испытуемой суспензии микроорганизмов с концентрацией от  $1,5 \times 10^8$  до  $5,0 \times 10^8$  для бактерий и от  $1,5 \times 10^7$  до  $5,0 \times 10^7$  для грибов;
3. Очистка дисков в растворе Decon (сурфактант) в течение 60 минут и промывка дистиллированной водой в течение 10 секунд;
4. Стерилизация тест-поверхностей 70% раствором изопропанола в течение 15 минут;
5. Высушенные тест-поверхности поместить в стерильные чашки Петри;
6. Нанесение испытуемой суспензии микроорганизмов (0,05 мл);
7. Подсушивание поверхностей до полного высыхания (не более 60 мин);
8. Нанесение ДС (0,1 мл);

# ПОВЕРХНОСТНЫЙ МЕТОД (EN 13697:2015)

9. Выдержка времени воздействия ДС на микроорганизм;
10. Перенос тест-поверхностей в контейнер, содержащий 10 мл нейтрализатора и стеклянные бусы, для остановки воздействия ДС на микроорганизм (5 мин);
11. Подготовка 10-кратных разведений нейтрализованной смеси от  $10^{-1}$  до  $10^{-2}$ ;
12. Посев нейтрализованной смеси по 2 образца объемом 1 мл из каждого разбавления на соответствующие питательные среды методом глубинного или поверхностного посева;
13. Восстановление испытуемой поверхности;
14. Проведение контроля с использованием воды вместо ДС.

## Оценка результатов:

Антимикробная активность считается подтвержденной, если демонстрируется снижение жизнеспособности микроорганизмов на 3 логарифма (для грибов), 4 логарифма (для бактерий) и более.

*Спасибо за внимание!*