

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь

Н.П. Жукова

«26» 11 2018г.

Регистрационный № 006-0618



МЕТОД ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЦИДНОГО
ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ ПО ОТНОШЕНИЮ К
ВОЗБУДИТЕЛЯМ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА
инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; Государственное учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Авторы: к.м.н. доцент Тонко О.В., профессор д.м.н. Коломиец Н.Д., к.м.н. доцент Ханенко О.Н., Федорович Е.В., к.м.н. доцент Гудкова Е.И., к.м.н. доцент Скороход Г.А., к.м.н. доцент Красько А.Г.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
26.11.2018
Регистрационный № 006-0618

**МЕТОД ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЦИДНОГО
ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ ПО ОТНОШЕНИЮ
К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. О. В. Тонко, д-р мед. наук, проф. Н. Д. Коломиец, канд. мед. наук, доц. О. Н. Ханенко, Е. В. Федорович, канд. мед. наук, доц. Е. И. Гудкова, канд. мед. наук, доц. Г. А. Скороход, канд. мед. наук, доц. А. Г. Красько

Минск 2018

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) позволяет установить эффективное дезинфицирующее средство (ДС) по отношению к возбудителям легионеллеза и рекомендовать к применению дезинфицирующие средства и их рабочие режимы, эффективные в отношении выделенных из воды и/или из искусственных водных систем, технологического оборудования и приборов культур бактерий рода *Legionella* — возбудителей легионеллеза.

Преимуществом предложенного метода является возможность оценки эффективности воздействия дезинфицирующих средств на свежевыделенные планктонные (суспензионные) формы бактерий и экспериментальные модели их биопленочных культур, в составе которых они находятся в содержащих воду техногенных объектах окружающей среды.

Настоящая инструкция предназначена для лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, осуществляющих микробиологические исследования, определяющие наличие возбудителя легионеллеза в объектах, потенциально опасных в отношении распространения инфекции.

Результаты оценки эффективности дезинфицирующих средств в отношении возбудителей легионеллеза позволят осуществлять выбор наиболее эффективных дезинфицирующих средств при проведении дезинфекционных мероприятий по очистке и обеззараживанию объектов, потенциально опасных в отношении распространения легионеллеза.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень медицинских изделий

1. Весы электронные (предел измерений 210 г, погрешность 0,001 г) или аналогичные (торсионные, др.).
2. рН метр — диапазон рН от 1 до 14; точность 0,01 рН.
3. Шкаф сушильный стерилизационный, поддерживающий температуру 160 (±5) °С.
4. Термостат суховоздушный, поддерживающий температуру 37 (±1) °С, 28 (±1) °С, 20 (±1) °С.
5. Стерилизатор паровой.
6. Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды ГОСТ 6709-72.
7. Облучатель бактерицидный.
8. Холодильник с температурой в камере от 4 до 8 °С.
9. Морозильная камера с температурой в камере до -20 °С.
10. Водяная баня, поддерживающая температуру 50 °С.
11. Прибор для мембранной фильтрации воды с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм.
12. Универсальная центрифуга для пробирок до 50 мл с роторами 6×50 мл (угловая скорость — до 6000 об/мин), 12×15 мл (угловая скорость — 3000-6000 об/мин), 30×2 мл (угловая скорость — до 12000 об/мин).
13. Микроскоп биологический.
14. Микроскоп стереоскопический.

15. Иммуноферментный анализатор.
16. Шкаф ламинарный (бокс биологической защиты).
17. Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83.

Перечень реактивов

1. Кислота соляная ГОСТ 3118-77.
2. Калий хлористый ГОСТ 4233-77.
3. Калия гидроокись ГОСТ 24363-80.
4. Натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) 5-водный ГОСТ 27068-86.
5. Натрий двууглекислый ГОСТ 2156-76.
6. Перекись водорода ГОСТ 10929.
7. Спирт этиловый ректифицированный медицинский ГОСТ 5962-67.
8. Спирт этиловый технический ГОСТ 18300-87.
9. Активированный уголь Р 72.270.3.
10. Глицин.
11. L-цистеин.
12. А-кетоглутаровая кислота.
13. Пирофосфат железа растворимый.
14. Полимиксин В сульфат 500000 ед.
15. Ванкомицина гидрохлорид.
16. Циклогексимид.
17. АСЕС-буфер (м-2-ацетамидо-2-аминоэтан-сульфанильная кислота).
18. Агар микробиологический ГОСТ 17206-84.
19. Дрожжевой экстракт ГОСТ 171-81.
20. Селективные питательные среды для выделения легионелл с соответствующими добавками.
21. Тест-системы для видовой идентификации *legionella pneumophila*.

Также необходимы следующие расходные материалы: посуда лабораторная (ГОСТ 1770-74), пробки различных размеров (силиконовые, резиновые и др., выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием), тампоны (свабы) в полипропиленовой пробирке в упаковке с аппликатором-палочкой, мембранные фильтры на основе ацетата целлюлозы/поликарбонатные для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35–47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью к фильтрации, имеющие сертификат качества, автоматические пипетки переменного объема.

Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными техническими и метрологическими характеристиками, а также других коммерческих питательных сред и растворов аналогичного назначения для выполнения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и растворы импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000; питательные среды и реактивы отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утверждённой в установленном порядке.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Мониторинг за циркуляцией возбудителей легионеллеза в объектах, потенциально опасных в отношении распространения легионеллеза с целью установления эффективного дезинфицирующего средства по отношению к возбудителям легионеллеза для рекомендации к применению дезинфицирующих средств и их рабочих режимов при проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения легионеллеза.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Подготовка к исследованию

Отбор проб воды проводят в соответствии с требованиями СТБ ГОСТ Р 51592-2001 «Вода. Общие требования к отбору проб» и СТБ ГОСТ Р 51593-2001 «Вода питьевая. Отбор проб» и другими действующими ТНПА на методы отбора. Отбор проб прочих объектов внешней среды производят в соответствии с инструкцией «Лабораторная диагностика легионеллеза. Методы обнаружения легионелл в объектах водной среды», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 08.12.2015 № 011-1115.

Отбор проб из крана. Краны и наконечники труб, из которых отбираются пробы для микробиологических исследований, должны быть дезинфицированы, лучше всего путем обжигания огнем при использовании пропитанного спиртом ватного тампона. При исследовании воды, поступающей из эксплуатационных, регулирующих резервуаров, водонагревателей и других устройств, пробы должны отбираться из подводящей и отводящей трубы как можно ближе к резервуару либо устройству.

Пробы воды объемом 1,0 л для микробиологического анализа на наличие легионелл отбирают в стерильные емкости. Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов. Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги) или завинчивающимися крышками с резиновыми уплотнителями. Многоцветная посуда, в т. ч. пробки, должны выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием. С целью дехлорирования воды в стерильные флаконы емкостью 500 мл вносят 2 мл 1,5 % раствора гипосульфита натрия, простерилизованного в автоклаве; или для забора используют емкости, содержащие кристаллы гипосульфита натрия из расчета 20 мг на 1 л воды. Поверхностные пробы отбирают специальным батометром, предназначенным для этих целей. Глубинные пробы отбирают специальным батометром, предназначенным для этих целей; допустимо использовать другие приспособления. Забор материала осуществляют стерильно, избегая

соприкосновения пробки и края емкости с любыми поверхностями. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность и не намокающей при транспортировке (ватные пробки не применять), и стерильным колпачком. Смывы с объектов (оборудования для кондиционирования и вентиляции, водонагревательных и охлаждающих систем, медицинского инструментария и т. д.) берут тампоном (свабом), смоченным стерильным физиологическим раствором, и помещают в пробирку со стерильным физиологическим раствором.

С учетом способности легионелл к образованию биопленок на поверхности водопроводного, промышленного, лабораторного и иного оборудования, связанного с циркуляцией и хранением воды, соответствующие участки поверхности также могут исследоваться на наличие легионелл. Соскобы влажных биопленок с поверхности, находящейся под водой или на границе соприкосновения воды и воздуха, берут сухими тампонами и помещают во флакон или пробирку. Соскобы биопленок с высохшей поверхности берут тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором, и помещают в пробирку, содержащую стерильный физиологический раствор.

Отбор проб производит специалист после прохождения инструктажа по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа. Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб воды с указанием места, времени отбора, фамилии специалиста, выявившего пробу, и другой информации (температура воды, погодные условия).

Доставку проб воды осуществляют в контейнерах при температуре 6–24 °С. При соблюдении указанной температуры транспортировки и хранения срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 24 ч. Хранение проб в холодильнике при температуре ниже 6 °С может привести к негативным результатам исследования проб в связи с возможным переходом легионелл в некультивируемое состояние. Если проба содержит дезинфектанты, и их нейтрализация не произведена сразу же после отбора, анализ проводят в течение 4 ч после отбора.

Подготовка проб к исследованию. Исходный образец предварительно фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон с 10 мл стерильного физиологического раствора. Для десорбции микрофлоры с фильтров флакон помещается на встряхиватель на 10–15 мин при температуре 18–25 °С. Далее смыв с поверхности фильтра помещают в центрифужную пробирку объемом 15 мл и центрифугируют при 3000–6000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость полностью удаляют для последующего обеззараживания. Осадок тщательно ресуспендируют стерильной пипеткой в 1 мл физиологического раствора и переносят в стерильную пробирку. Для снижения уровня контаминации пробы посторонней микрофлорой одну ее часть подвергают прогреванию, а другую обрабатывают кислотным буфером. Для прогревания из подготовленного сконцентрированного образца отбирают 0,2 мл и переносят в

стерильную пробирку, после чего помещают пробирку на водяную баню при 50 °С и прогревают в течение 30 мин.

Для обработки кислотным буфером 0,2 мл сконцентрированного образца переносят в стерильную пробирку и добавляют 0,2 мл раствора кислотного буфера KCl-HCl, pH = 2,2, инкубируют при комнатной температуре в течение 4–5 мин. Кислотную обработку проводят непосредственно перед посевом на плотные питательные среды. Образцы биопленок, смывы с поверхностей подвергают концентрированию с помощью центрифугирования, кислотной и термической обработки аналогично концентрированию проб воды.

Подготовленный для исследования материал засевают на питательные среды, предназначенные для культивирования легионелл (*Legionella* CYE Agar Base) с обязательным добавлением ACES-буфера, L-цистеина, растворимого пирофосфата железа. Параллельно используют чашки с питательной средой без антибиотиков, а для ингибирования роста посторонней микрофлоры посевы осуществляют на питательные среды с добавлением смеси антибиотиков: полимиксин В 40 ЕД/мл + пенициллин 0,5 мкг/мл + амфотерицин В 80 мкг/мл. Посевы инкубируют во влажной атмосфере при температуре 35 °С с созданием атмосферы 2,5–3 % CO₂. Рост колоний на питательных средах с добавлением смеси антибиотиков из посева первичного материала наблюдается на 4–5-е сут. При подозрении на рост легионелл колонии необходимо пересеять на среду с ростовыми добавками и контрольную среду без добавок, не поддерживающую рост легионелл. Рост во втором пассаже на специальной среде при отсутствии роста на контрольной среде позволяет сделать предварительное заключение о наличии в образце *Legionella spp.* На селективных средах колонии легионелл диаметром 1–2 мм вырастают на 4–5-е сут.

Для идентификации легионелл и определения серогруппы используют набор для латекс-агглютинации, который позволяет определить *Legionella pneumophila* серогруппы 1, *Legionella pneumophila* серогрупп 2–14, *Legionella spp.*

Оценка эффективности биоцидного действия дезинфицирующих средств по отношению к возбудителям легионеллеза

При использовании метода существует возможность оценки эффективности воздействия дезинфицирующих средств по отношению как к свежевыделенным планктонным (суспензионным) формам легионелл, так и их биопленочным культурам.

При исследовании необходимо использовать свежевыделенные изоляты бактерий с минимальным количеством пассажей.

При применении метода следует убедиться в чистоте исследуемой культуры.

При оценке эффективности дезинфектантов должны использоваться препараты из различных групп активно действующих веществ (АДВ), применяемых для дезинфекции объектов, потенциально опасных в отношении распространения легионеллеза. Необходимо владеть информацией о рекомендуемых режимах их применения.

Перед использованием питательных сред, растворов дезинфицирующих средств и нейтрализатора необходимо выдерживать их при комнатной температуре не менее 1 ч.

Технология метода

1-й этап: определить эффективность воздействия дезинфектантов по отношению к планктонным (суспензионным) формам легионелл.

Оценку действия дезинфектантов по отношению к планктонным (суспензионным) формам легионелл рекомендуется изучать в соответствии с алгоритмом (приложение).

Противолегионеллезную активность дезинфектантов определяют с исследуемыми и контрольными культурами легионелл, выращенными в течение 72 ч во влажной атмосфере при температуре 35 °С с созданием атмосферы 2,5–3 % CO₂ на питательной среде, предназначенной для культивирования легионелл, с обязательным добавлением ACES-буфера, L-цистеина и растворимого пирофосфата железа. Готовят взвеси бактерий в 4 мл 0,5 % раствора хлорида натрия. Взвеси стандартизируют, используя оптический стандарт мутности до 1,5 – 8x10⁹ КОЕ/мл.

Использование химических нейтрализаторов дезинфицирующих средств является обязательным этапом. Для нейтрализации антимикробного действия дезинфицирующих средств рекомендуется преимущественно жидкая среда с гидролизатом казеина, соевым лецитином и полисорбатом 20 (SCDLP 20 бульон) Состав: панкреатический гидролизат казеина — 20,0 г; соевый лецитин — 5,0 г; полисорбат 20 — 40,0 см; вода — 960,0 см.

Приготовление нейтрализатора: растворяют полисорбат 20 в 960,0 см воды, помешивая при нагревании, на водяной бане при температуре 49±2 °С. Добавляют панкреатический гидролизат казеина и соевый лецитин. Нагревают приблизительно 30 мин до полного растворения. Перемешивают и разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации рН среды должен быть равен 7,3±0,2 ед. при комнатной температуре.

При необходимости могут использоваться другие нейтрализующие агенты. Например, универсальный нейтрализатор — полисорбат-80 30 г/л, сапонин 30 г/л, L-гистидин 1 г/л, лецитин 3 г/л, тиосульфат натрия 5 г/л, 0,0025 М фосфатный буфер довести до 1000 мл.

Учет результатов проводится по истечении времени, необходимого для культивирования легионелл в термостате во влажной атмосфере при температуре 35 °С с созданием атмосферы 2,5–3 % CO₂ на питательной среде, предназначенной для легионелл — от 5 до 7 сут в зависимости от фирмы изготовителя питательной среды.

Учет результатов проводят по количеству выросших на чашке Петри колоний в опыте и контроле. Рассчитывают среднее число живых бактерий в контроле, число выживших бактерий в опыте (КОЕ/мл), определяют десятичные

логарифмы и факторы редукции (RF) числа бактерий в опыте по сравнению с контролем.

Оценивают уровень активности дезинфектанта при разных экспозициях, концентрациях. Эффективность дезинфектантов по отношению к штаммам легионелл определяют по величине фактора редукции (RF), значение которого должно быть более 5. Рассчитывают фактор редукции путем вычитания десятичных логарифмов КОЕ/мл исследуемых штаммов в контроле и опыте. Количество колоний микроорганизмов пересчитывают на содержание микроорганизмов в 1 мл жидкости. Противомикробную активность рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{Log RF} = \log (\text{КОЕ VW}) - \log (\text{КОЕ NW}).$$

где КОЕ VW — количество КОЕ микроорганизмов на 1 мл в контроле;

КОЕ NW — количество КОЕ на 1 мл после воздействия дезинфицирующего средства.

2-й этап: изучить эффективность воздействия дезинфектантов на биопленки легионелл.

Получение биопленок легионелл. Оценка способности легионелл к пленкообразованию с использованием планшетного метода минимизирует риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов при высокой чувствительности, специфичности и точности. Сущность метода заключается в посеве изучаемых штаммов легионелл в жидкую питательную среду в ячейки 96-луночного полистиролового планшета. После инкубации производится окраска бактериальной пленки и оценка интенсивности окрашивания с использованием спектрофотометра или иммуноферментного анализатора.

Выращенные на питательной среде, предназначенной для культивирования легионелл, с добавлением ACES-буфера, L-цистеина и растворимого пирофосфата железа, 72-часовые культуры тестируемых штаммов легионелл (суспензии микроорганизмов с оптической плотностью 5 ед. по Тарасевичу) разводят свежей питательной средой (триптон-соевый бульон с глюкозой) 1:10. Параллельно 1 мл 72-часовых культур тестируемых штаммов легионелл засевают в 5 мл стерильной воды.

Полученные суспензии культур вносят по 150 мкл в ячейки 96-луночного полистиролового планшета (от 4 до 12 лунок для каждого штамма). Для контроля фона в лунки (от 4 до 12 лунок) вносят питательную среду, предназначенную для инкубирования легионелл. Параллельно водные суспензии культур вносят по 150 мкл в ячейки 96-луночного полистиролового планшета (от 4 до 12 лунок для каждого штамма). Для контроля фона в лунки вносят стерильную дистиллированную воду.

Планшет с питательной средой инкубируют при температуре 28 ± 1 °C в течение 96 ± 2 ч, планшет с легионеллами в стерильной дистиллированной воде инкубируют при температуре 28 ± 1 °C в течение 2 недель.

По окончании инкубации оптическую плотность выросших планктонных клеток определяют с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм) или иммуноферментного анализатора.

Содержимое ячеек осторожно аспирируют. Вносят по 150 мкл стерильной дистиллированной воды и 15 мкл 1 % спиртового раствора кристаллвиолета. Планшет инкубируют при температуре 20 ± 1 °С в течение 45 мин. Затем краситель осторожно удаляют, промывают лунки дважды дистиллированной водой. Вносят по 200 мкл 96 % этилового спирта на 45 мин при температуре 20 ± 1 °С. Интенсивность окрашивания спирта в лунках определяют с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм) или иммуноферментного анализатора.

Для оценки способности бактерий к образованию биопленок необходимо вычислить среднее значение оптической плотности лунок отрицательного контроля (ОП_{ОК}). Для каждого штамма также определяется среднее значение оптической плотности лунок (ОП_{штамма}). Минимальным значением оптической плотности для лунок с микроорганизмами, способными к образованию биопленки (ОП_{min}), является сумма среднего значения оптической плотности лунок отрицательного контроля и 3 стандартных отклонений среднего значения оптической плотности отрицательного контроля:

$$\text{ОП}_{\text{min}} = \text{ОП}_{\text{ОК}} + 3 * \text{стандартное отклонение ОП}_{\text{ОК}}$$

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей.

Таблица — Степень способности к образованию биопленок исследуемых штаммов микроорганизмов

Среднее значение ОП _{штамма}	Способность к пленкообразованию
$\leq 2 \times \text{ОП}_{\text{min}}$	Отсутствует/слабо выражена
$2-4 \times \text{ОП}_{\text{min}}$	Умеренная
$> 4 \times \text{ОП}_{\text{min}}$	Сильная

3-й этап: изучить эффективность воздействия дезинфектантов по отношению к пленочным формам легионелл.

Выращенные на питательной среде, предназначенной для культивирования легионелл, 72-часовые культуры легионелл (суспензии микроорганизмов с оптической плотностью 10 ед. по Тарасевичу на 1,0 мл смывной жидкости) разводят триптиказо-соевым бульоном 1:10 и вносят по 1 мл в лунки планшета типа Costar. Инкубируют планшет с питательной средой и культурами легионелл при температуре 28 ± 1 °С не менее 5 сут. Через 5 сут содержимое ячеек осторожно аспирируют для удаления планктонных форм. При оценке числа микроорганизмов в сформированных биопленках необходимо удостовериться, что число легионелл составляет 5 ед. по Тарасевичу на 1,0 мл смывной жидкости (проводят высевы из каждой контрольной для этого этапа лунки на питательную среду *Legionella* СУЕ Agar Base с ростовой и селективной добавкой и оценивают рост и количество легионелл).

Обязательным этапом является необходимость убедиться в формировании микробных биопленок на дне лунок. Для этого используют отдельный ряд лунок, который не включают в дальнейшее исследование воздействия дезинфектантов по

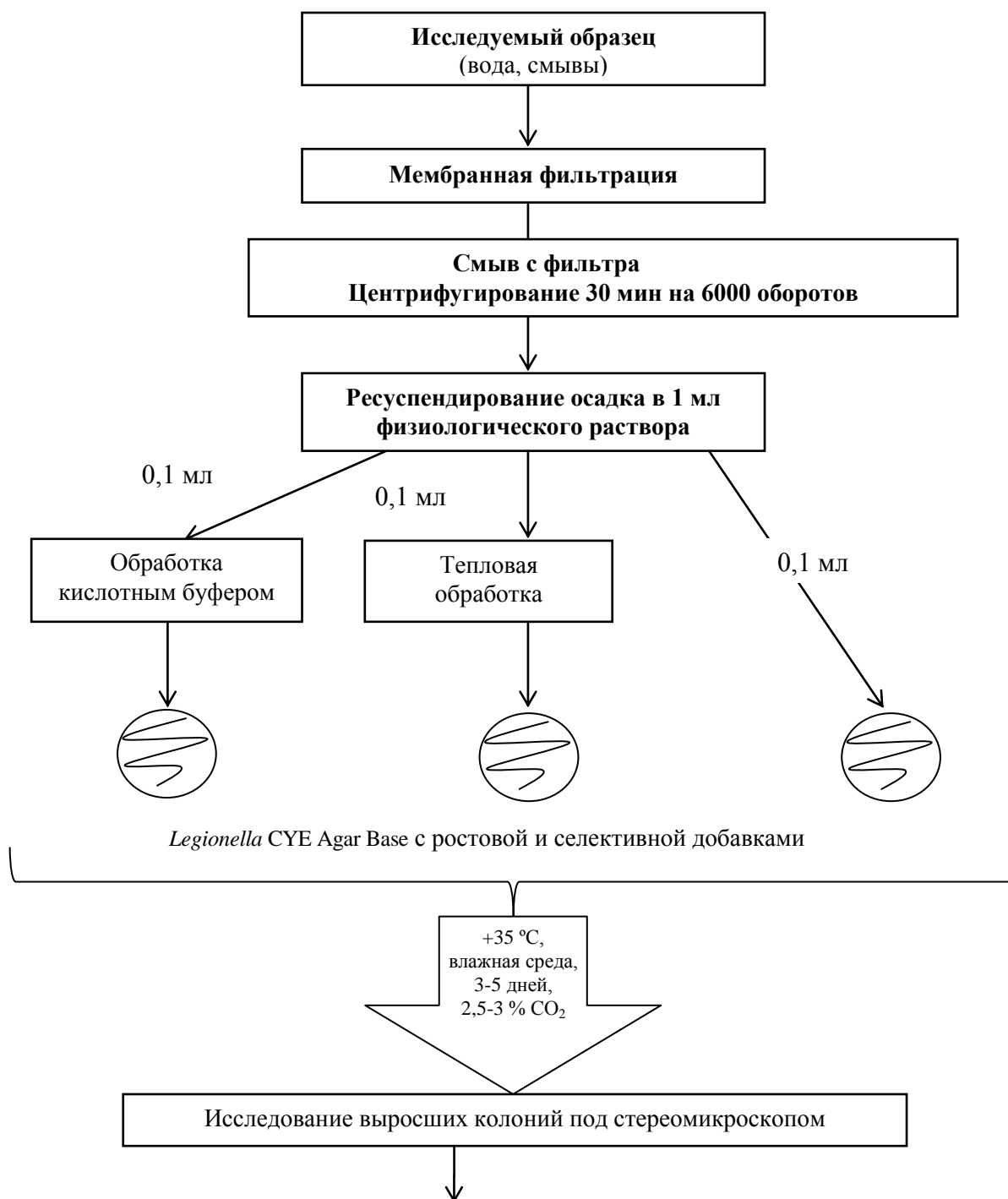
отношению к пленочным формам легионелл. В эти лунки вносят по 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1 % спиртового раствора кристаллвиолета. Планшет инкубируют при температуре 20 ± 1 °С в течение 45 мин. Затем краситель осторожно удаляют, промывают лунки дважды дистиллированной водой, вносят по 200 мкл 96 % этилового спирта на 45 мин при температуре 20 ± 1 °С. Интенсивность окрашивания спирта в лунках планшета определяют визуально, а пленку рассматривают под увеличением.

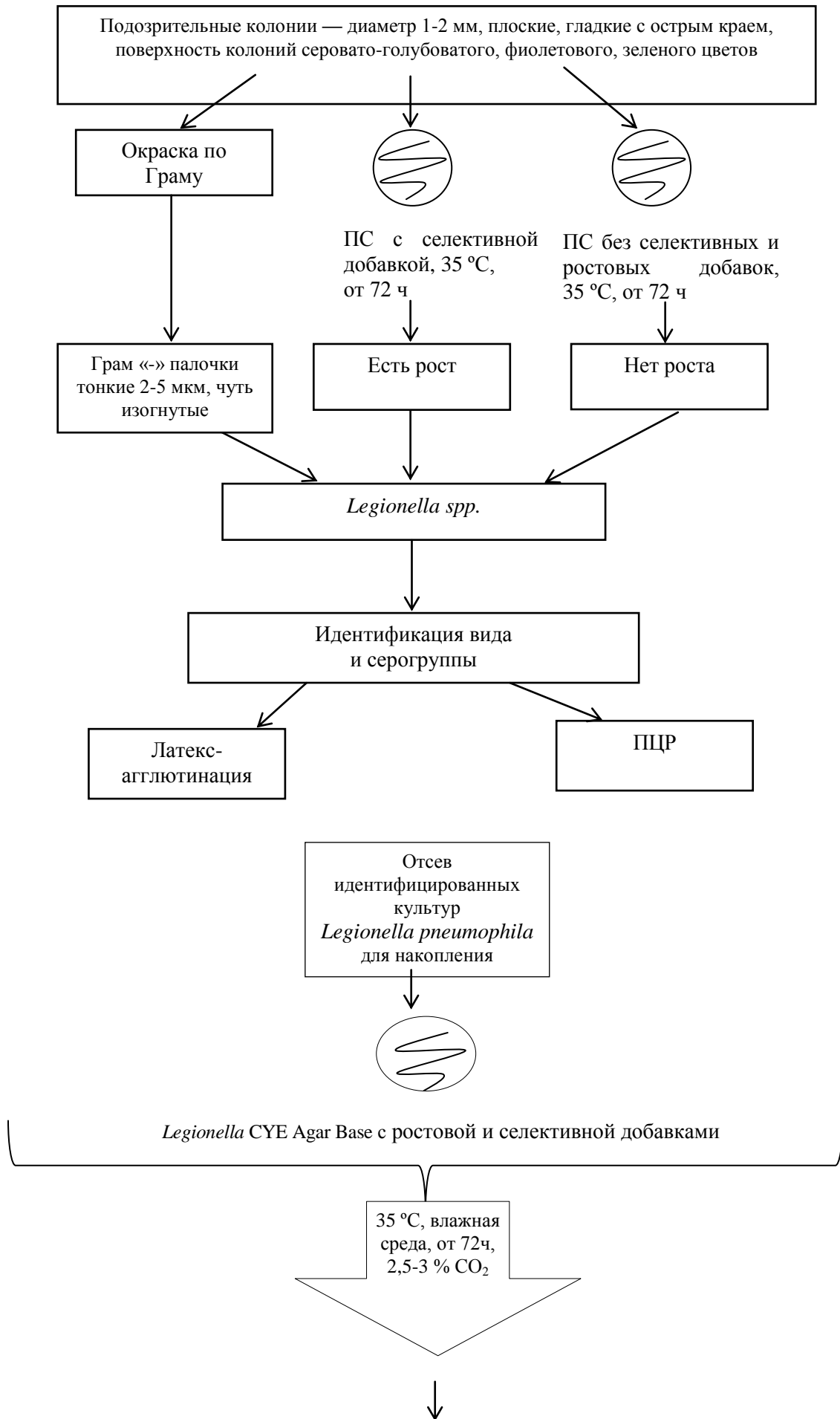
Для оценки воздействия дезинфектантов по отношению к пленочным формам легионелл рекомендуется использовать средства из различных групп АДВ. Выбор режима дезинфекции следует осуществлять в соответствии с инструкциями по применению дезинфицирующего средства с целью его использования для обработки саун, бассейнов, аквапарков и/или для обработки санитарно-технического оборудования.

После удаления планктонных культур в лунки планшета в рабочих концентрациях в объеме 0,9 мл вносят разведения тестируемых дезинфицирующих средств. После окончания рабочей экспозиции раствор дезинфицирующего средства полностью удаляют из лунок, вносят нейтрализатор в объеме 1 мл. После 10-минутной экспозиции из лунок удаляют нейтрализатор, вносят по 1 мл стерильной дистиллированной воды, ресуспендируют. Затем по 0,5 мл суспензии высевают на питательную среду *Legionella* CYE Agar Base с ростовой и селективной добавкой для оценки наличия роста и подсчета количества легионелл. Чашки с посевами помещают при температуре 35 °С с созданием влажной атмосферы и 2,5–3 % CO₂, инкубируют до 7 сут. Выросшие колонии подвергают идентификации.

Результаты воздействия дезинфицирующих средств по отношению к пленочным формам легионелл учитывают по присутствию (отсутствию роста) на чашке Петри колоний легионелл в опыте и контроле.

Алгоритм оценки эффективности биоцидного действия дезинфицирующих средств по отношению к возбудителям легионеллеза





Взвесь испытуемых и контрольных культур легионелл приготовить в 4 мл 0,5 % раствора хлорида натрия

Взвеси стандартизируют, используя оптический стандарт мутности до $1,5-8 \times 10^9$ КОЕ/мл

Выбор режима дезинфекции — в соответствии с инструкциями по применению к ДС и рекомендуемому производителем в целях:

обеззараживания воды и воды плавательных бассейнов

обеззараживания поверхностей джакузи, саун, бассейнов, аквапарков и др.

обеззараживания санитарно-технического оборудования

фунгицидный режим дезинфекции

Выбор химических нейтрализаторов ДС осуществляется в соответствии с рекомендациями к каждой группе ДС. При отсутствии рекомендаций или невозможности их выполнения рекомендуется:

жидкая среда с гидролизатом казеина, соевым лецитином и полисорбатом 20 (SCDLP 20 бульон)

универсальный нейтрализатор

Этапы исследования в соответствии с настоящей инструкцией

контроль

Legionella CYE Agar Base с ростовой и селективной добавками
35 °С, влажная среда,
5-7 сут, 2,5-3 % CO₂

опыт

Учет результатов. Идентификация и подсчет количества выросших колоний в опыте и контроле. Высчитывают среднее число живых бактерий в контроле, число выживших бактерий в опыте (КОЕ/мл), определяют десятичные логарифмы и факторы редукции числа бактерий в опыте по сравнению с контролем. Оценивают уровень активности дезинфектанта при разных экспозициях, концентрациях