

3.1.3.5. Дезинфектология

**Методы изучения и оценки  
Туберкулоцидной активности  
дезинфицирующих средств**

Методические указания

МУ 3.5.2596-10

Издание официальное

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

Москва • 2010 г.

Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. - 54 с.

1. Разработаны ФГУН «НИИ дезинфектологии» Роспотребнадзора (Л.С.Федорова, И.М.Цвирова); ФГУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Росмедтехнологий (В.В. Канищев, Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко, Д.В. Вахрушева); Роспотребнадзором (Л.С. Бойко)

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Роспотребнадзора (протокол № 3 от 03.12.09)

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г.Онищенко 20.03.10. *(подписано 29 марта 2010 г.)*.

4. Введены впервые.

**Методики приготовления питательных сред для  
культивирования тест-микобактерий, предназначенных  
для изучения и оценки туберкулоцидной активности  
дезинфицирующих средств и их субстанций**

***Методика приготовления среды Левенштейна-Йенсена***

Среда Левенштейна-Йенсена – международная среда, широко используемая в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности.

Это плотная яичная среда, на которой видимый рост *M. terrae* получают приблизительно на 14-21-й день после посева.

Для чистоты эксперимента желательно использовать готовую питательную среду в стандартных пробирках с завинчивающимися крышками.

При невозможности приобретения готовой среды, ее можно приготовить самостоятельно.

В состав среды Левенштейна-Йенсена входят следующие компоненты:

*1. Раствор минеральных солей:*

- Калий однозамещенный фосфорнокислый	2,4 г
- Магний лимоннокислый	0,6 г
- Магний сернокислый	0,24 г
- L- аспарагин	3,6 г
- Глицерин	12,0 мл
- Вода дистиллированная	600 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в теплой дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. L-аспарагин рекомендуется растворять отдельно и вносить последним. Затем солевой раствор стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121<sup>0</sup>С) в течение 20 - 30 минут. Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

*2. Раствор малахитового зеленого:*

- Малахитовый зеленый	— 2 г
- Стерильная дистиллированная вода	— 100 мл

Взвешенный порошок малахитового зеленого растворяют в стерильной теплой дистиллированной воде и помещают раствор в термостат на 1-2-2,5 часа для большего растворения. Затем фильтруют раствор через бумажный фильтр, разливают по флаконам или небольшим колбам и стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121<sup>0</sup>С) в течение 30 минут. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, и при появлении осадка или изменении окраски его заменяют свежим раствором.

### 3. Яичная масса

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, затем оставляют на 30 минут в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70% этиловый спирт на 30 минут. Перед тем, как начать работу с чистыми и сухими яйцами, рекомендуется тщательно вымыть руки с мылом и щеткой. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20–25 яиц, в зависимости от их величины). Тщательно взбивают яичную массу стерильным венчиком или в стерильном миксере при минимальной скорости.

#### Приготовление среды.

В большую стерильную емкость, соблюдая правила асептики, помещают следующие растворы:

Раствор минеральных солей	— 600 мл
Гомогенизированная яичная масса	— 1000 мл

Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через 4-х слойный стерильный марлевый фильтр. Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и *в течение не более 15 минут* разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не сформировался осадок.

#### Коагуляция (свертывание) среды.

Для свертывания среды используют специальные аппараты-свертыватели типа “АСПС”. Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования скошенной поверхности среды высотой 8 – 10 см. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 85<sup>0</sup>С в течение 45 минут.

#### Хранение среды.

Готовую питательную среду проверяют на стерильность, помещая 10 пробирок из вновь приготовленной партии в термостат при 37<sup>0</sup>С на 3 суток. По истечении времени инкубации в пробирках на питательной среде должен отсутствовать микробный рост. В случае наличия роста приготовленная партия среды подлежит уничтожению. Приготовленная партия среды должна иметь этикетку с датой изготовления и сохраняться в холодильнике при 4<sup>0</sup>С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели.