Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2596—10

Издание официальное

Москва • 2010

gost.e-ecolog.ru

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

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2596—10

ББК 51.9
М54

М54 **Методы** изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—54 с.

ISBN 978—5—7508—0882—3

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 санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г. Г. Онищенко 20.03.10.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

ISBN 978—5—7508—0882—3

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Область применения 5
2. Общие положения 5
3. Тест-микроорганизмы для изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций 8
3.1. Требования к тест-микроорганизмам 9
3.2. Получение и хранение исходной рабочей культуры тест-микобактерий 9
3.3. Приготовление рабочей суспензии тест-микобактерий, *используемой в эксперименте при испытании* дезинфицирующих средств, и контроль ее качества 11
3.4. Определение биологической концентрации тест-микроба в рабочей суспензии 12
3.5. Методики определения устойчивости тест-микобактерий 14
3.5.1. Определение устойчивости тест-микобактерий к воздействию температуры 14
3.5.2 Определение устойчивости тест-микобактерий к эталонным дезинфицирующим средствам 15
4. Обеспечение стандартности условий проведения исследований туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций 17
5. Методы исследований и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций *in vitro* 20
5.1. Суспензионный метод 20
5.2. Метод батистовых тест-объектов 23
5.3. Методы изучения факторов, влияющих на туберкулоцидную активность дезинфицирующих средств и их субстанций 27
6. Методы изучения туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды 28
6.1. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания поверхностей помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и других объектов 29
6.2. Обеззараживание предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких) 31
6.3. Обеззараживание посуды столовой, лабораторной и из-под выделений 33

6.4. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания изделий медицинского назначения (ИМН), включая эндоскопы 34
6.4.1. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания ИМН из различных материалов (кроме эндоскопов) 34
6.4.2. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания эндоскопов 36
6.4.3. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств для дезинфекции высокого уровня (ДВУ) эндоскопов 37
6.5. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани 38
6.6. Исследование туберкулоцидной эффективности камерного метода обеззараживания 40
6.7. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании рук в резиновых перчатках 40
6.8. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, кал, мокрота) и крови 41
6.9. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов 44
6.10. Методы определения туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств при обеззараживании воздуха 45
7. Методы исследования и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств в практических условиях 46
8. Нормативные ссылки 47
Приложение 1. Характеристика тест-микроорганизмов по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам 48
Приложение 2. Методики приготовления питательных сред для культивирования тест-микобактерий, предназначенных для изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций 49
Приложение 3. Материалы и оборудование, необходимые для проведения испытаний 53

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 марта 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.5. ДЕЗИНФЕКТОЛОГИЯ

Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2596—10

1. Область применения

Настоящие методические указания предназначены для организаций независимо от их организационно-правовой формы и формы собственности, осуществляющих разработку, изучение, производство, испытание, государственную регистрацию, сертификацию, применение, а также осуществляющих надзор и производственный контроль за производством и применением дезинфицирующих средств (ДС) и их субстанций (действующих веществ – ДВ), обладающих туберкулоцидной активностью.

2. Общие положения

Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии» [1] регламентирует проведение неспецифической профилактики инфекционных заболеваний. В комплекс неспецифических профилактических мероприятий входит дезинфекция объектов окружающей среды с использованием различных дезинфицирующих средств (ДС), вызывающих гибель тех или иных видов болезнетворных микроорганизмов при регламентированных параметрах технологии их применения (режимах обработки).

ДС, обладающие туберкулоцидной активностью, необходимы для обеззараживания различных объектов, контаминированных возбудите-

лем туберкулеза, отличающимся от всех других вегетативных форм болезнетворных бактерий более высокой устойчивостью к различным неблагоприятным факторам, в т. ч. к дезинфицирующим средствам.

Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире в настоящее время остается напряженной, кроме того, она усугубляется появлением и распространением суперустойчивых к химическим противотуберкулезным веществам форм возбудителя. Такие микобактерии зачастую характеризуются более высокой сохраняемостью во внешней среде, что приводит к возникновению внутрибольничных вспышек нозокомиального туберкулеза. Кроме того, все чаще стали регистрироваться случаи заболеваний, вызванных нетуберкулезными видами микобактерий (НТМБ), которые обладают естественной резистентностью к воздействию негативных факторов окружающей среды. НТМБ являются возбудителями микобактериозов человека и наиболее опасны для больных с иммунодефицитными состояниями, т. к. существенно сокращают сроки их жизни.

В такой неблагоприятной эпидемической ситуации по туберкулезу и микобактериозам возрастает роль неспецифических противоэпидемических мероприятий, среди которых ведущую роль занимает химическая дезинфекция, направленная на уничтожение возбудителей на объектах внешней среды, имеющих значение в передаче инфекции.

Как известно, успех проведения химической дезинфекции напрямую зависит от соблюдения рекомендаций инструкций по применению дезинфицирующих средств, правильного выбора эффективного режима (концентрация, экспозиция, способ обработки). Помимо этого, дезинфекционные мероприятия будут эффективны лишь в том случае, когда режимы дезинфекции отработаны на адекватном по устойчивости к реальным возбудителям тест-микроорганизме.

В нашей стране для разработки туберкулоцидных режимов применения ДС используют сапрофитный штамм *Mycobacterium* B_5, который изначально был предложен как тест-микроорганизм для оценки качества проведения камерной дезинфекции в очагах туберкулеза, поскольку обладал естественной резинстентностью к температурному фактору [2, 3]. Более того, результаты исследований по сравнительной оценке устойчивости микобактерий к химическим веществам, проведенные в 50—60 гг. прошлого столетия, свидетельствуют о меньшей устойчивости *Mycobacterium* B_5 по сравнению с вирулентными штаммами микобактерий. Обоснованных экспериментальных данных по выбору *Mycobacterium* B_5

для оценки туберкулоцидной активности химических средств дезинфекции в открытой литературе не найдено.

За рубежом для разработки туберкулоцидных режимов применения ДС используют такие штаммы как *M. Terrae* и *M. avium* [4]. Насколько чувствительность к ДС всех перечисленных тест-микобактерий адекватна реальным возбудителям туберкулеза и микобактериозов сказать трудно, поскольку такие сведения в литературе отсутствуют.

В связи с вышесказанным представлялось актуальной задачей для дезинфектологии и фтизиатрической практики проведение экспериментов по сравнительной оценке чувствительности тест-микобактерий к воздействию ДС разных химических групп. Исследования, проведенные в НИИД и на базе лаборатории микробиологии и ПЦР диагностики Уральского НИИ фтизиопульмонологии (г. Екатеринбург), показали, что *Mycobacterium* B_5 является самым чувствительным к воздействию большинства ДС видом микобактерий. Наиболее устойчивыми оказались *M. Terrae*, *M. Avium-intracellulara* и *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

Тест-микроорганизм *M. Terrae* является наиболее подходящей моделью для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС, поскольку в наибольшей степени соответствует устойчивости патогенных микобактерий.

На основании этих данных, а также учитывая, что сапрофитные микроорганизмы более удобны и безопасны в работе, чем патогенные виды микобактерий, наиболее адекватной моделью для тестирования химических ДС является *M. Terrae.* При оценке туберкулоцидной эффективности физических (температурных) методов дезинфекции в качестве тест-микроорганизмов рекомендуется использовать *Mycobacterium* B_5.

Данные методические указания регламентируют методы и технологию изучения, а также оценки туберкулоцидной активности субстанций для производства ДС, туберкулоцидной активности и эффективности химических, физических и комбинированных ДС при обеззараживании различных объектов, контаминированных наиболее устойчивым видом микобактерий с учетом максимально возможного уровня контаминации объектов возбудителем туберкулеза в практических условиях.

Исследования туберкулоцидной активности субстанций, ДС и эффективности режимов применения ДС включают:

- выбор и подготовку культур тест-микроорганизмов для изучения туберкулоцидной активности ДС и субстанций;

• обеспечение стандартности условий проведения исследований туберкулоцидной активности ДС и субстанций;

• методы исследований и оценки результатов туберкулоцидной активности ДС и субстанций *in vitro* (суспензионный метод, метод батистовых тест-объектов);

• методы исследований туберкулоцидной эффективности ДС с использованием искусственно контаминированных тест-микобактериями различных тест-объектов с целью разработки режимов обеззараживания тех или иных объектов в отношении возбудителя туберкулеза (поверхностей в помещениях, транспорта, санитарно-технического оборудования, мебели, посуды, белья, одежды, предметов ухода за больными, медицинских приборов, инструментов и других изделий медицинского назначения и т. д.);

• методы исследований туберкулоцидной эффективности ДС в практических условиях.

3. Тест-микроорганизмы для изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций

К применению в отечественной медицинской практике для дезинфекции при туберкулезе предлагаются различные ДС как отечественного, так и зарубежного производства, имеющие туберкулоцидные режимы, разработанные с использованием наиболее устойчивых тест-микроорганизмов, что должно гарантировать их эффективность в отношении возбудителя.

Исследование и оценку туберкулоцидной и микобактерицидной (в отношении непатогенных микобактерий) активности ДС, предлагаемых для применения на территории России, проводят, используя в качестве тест-микроорганизмов:

• агаровую культуру *Mycobacterium* B_5 для оценки эффективности и разработки туберкулоцидных режимов камерного обеззараживания различных объектов;

• агаровую культуру *Mycobacterium terrae* (DSM 43227) для оценки активности ДС и разработки режимов их применения при обеззараживании в отношении возбудителя туберкулеза и микобактериозов;

• агаровую культуру *Mycobacterium tuberculosis* для подтверждения эффективности разработанных режимов применения ДС в отношении возбудителей туберкулеза и микобактериозов в практических условиях.

3.1. Требования к тест-микроорганизмам

Тест-микобактерии должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические, тинкториальные и ферментативные свойства, присущие данному штамму (прилож. 1), и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС и температуре. Культура *Mycobacterium* B_5 должна быть устойчива к температуре 60 °С в течение 60 мин. Показатели устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам, которым должна соответствовать культура *Mycobacterium terrae* приведены в табл. 1.

Таблица 1

Устойчивость *Mycobacterium terrae* к эталонным дезинфицирующим агентам и средствам

Действующее вещество	Концентрация раствора, %	Время гибели *Mycobacterium terrae*, не менее (мин)
Хлорамин Б (28,0 % по активному хлору)	5,0	120
Глутаровый альдегид	0,5	60
Перекись водорода	4,0	60

Тест-микобактерии *M. terrae* могут быть приобретены в виде сухой культуры в ампулах (после лиофильной сушки) в Немецком музее микроорганизмов и клеточных культур (Deutcshe Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под № DSM 43227. Тест-микобактерии штамма B_5 могут быть приобретены в коллекции Музея микроорганизмов ФГУН Научно-исследовательского института дезинфектологии (ФГУН НИИД) Роспотребнадзора.

3.2. Получение и хранение исходной рабочей культуры тест-микобактерий

Для выращивания культур тест-микобактерий используют плотные питательные среды. Перечень и методика приготовления питательных сред для культивирования тест-микобактерий, предназначенных для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций, приведены в прилож. 2. В отличие от питательных сред, рекомендуемых в стандарте *NEN-EN 14476*, использование приведенных в приложении питательных сред позволяет получать результат оценки туберкулоцидной активности ДС не на 21, а на 10—14 сутки.

Для получения культуры штамма тест-микобактерий ампулу с лиофилизированной музейной культурой этого штамма вскрывают в асептических условиях следующим образом: ватным тампоном, смоченным 70 % этиловым спиртом, обрабатывают поверхность ампулы, затем нагревают ее запаянный конец в пламени горелки до образования на ампуле трещины. К накаленному концу ампулы прикладывают ватную пробку, смоченную стерильной водой. После этого ударом металлического инструмента (скальпель, пинцет) по трещине откалывают конец ампулы. Стерильной пастеровской пипеткой в ампулу вливают 1,0 мл стерильной дистиллированной воды и оставляют в течение 30 мин при комнатной температуре для растворения лиофилизата и получения суспензии. Суспензию, приготовленную из музейной тест-культуры, рассевают по 0,1 мл в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» (всего 10 пробирок). Посевы инкубируют в термостате при 37 °С в течение 5—7 суток.

С выросшими на питательных средах культурами *M. terrae* далее работают следующим образом:

- полученную биомассу снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с поверхности питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» со всех пробирок;
- помещают в пробирку с 10 мл бульона Миддлбрука 7Н9 с 10 % ADC ростовой добавкой и гомогенизируют;
- доводят объем полученной суспензии до 100 мл бульоном Миддлбрука 7Н9 и по 0,5 мл суспензии вносят в микропробирки;
- подписывают на каждой пробирке наименование штамма и дату;
- замораживают при –70 °С и оставляют в таком состоянии для длительного хранения.

Это самый эффективный способ длительного (десятилетиями) хранения культур с обеспечением сохранения биологических свойств тест-микобактерий. При отсутствии такой возможности суспензию в микропробирках замораживают в бытовом холодильнике при –20 °С. Срок хранения культуры в таких условиях – не более 5 лет.

Данная методика получения и хранения исходной рабочей культуры тест-микобактерий позволяет длительный период времени проводить испытания ДС с максимальным обеспечением стандартности свойств тест-микобактерий, в т. ч. по устойчивости к различным факторам, поскольку исключает необходимость многократного пересева, приводящего, как известно, к изменению биологических свойств микроорганизмов.

Полученная и хранящаяся таким образом культура тест-микобактерий используется для получения агаровой культуры тест-микобактерий (первый пассаж) и приготовления из нее рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой для проведения испытаний ДС.

3.3. Приготовление рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой в эксперименте при испытании дезинфицирующих средств, и контроль ее качества

Для получения первого пассажа культуры тест-штамма микобактерий, используемой при оценке ДС, необходимое для исследования количество хранящихся при температуре –70 или –20 °С микропробирок (2 штуки на 1 исследование) с данным штаммом микобактерий размораживают при комнатной температуре, переносят по 0,1 мл содержимого в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» и инкубируют в термостате при 37 °С в течение 14 суток. Выросшую на плотной питательной среде в пробирках культуру используют для приготовления рабочей суспензии тест-микобактерий данного штамма.

Одна или несколько пробирок может быть использована для получения второго пассажа культуры тест-микобактерий этого штамма. Для этого культуру первого пассажа в пробирке снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с плотной питательной среды, помещают в толстостенную стеклянную пробирку и тщательно растирают, постепенно добавляя по каплям стерильную дистиллированную воду. Полученную суспензию рассевают на плотную питательную среду тем же способом, который использовался для получения первого пассажа.

Культуры тест-микроорганизмов подвергают контролю их качества. В частности, непосредственно перед использованием культур для исследовательских целей необходимо убедиться в том, что тест-штаммы, выросшие на питательной среде, не загрязнены посторонней микрофлорой. Для оценки роста культур микобактерий тест-штаммов визуально просматривают каждую пробирку и учитывают характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Проводят микроскопию мазка выросших культур методом окраски по Циль-Нильсену (*M. terrae* представляют собой короткие прямые палочки малиново-красного цвета, располагающиеся в мазке параллельно друг другу, наподобие частокола. Размер клеток микобактерий 0,2—0,6 × 1—10 мкм).

Рабочую суспензию культуры тест-микобактерий готовят из тест-штамма первого и/или второго пассажей, выросших на плотной питательной среде. **Дальнейшее субкультивирование недопустимо!**

Для приготовления рабочей суспензии культуру микобактерий снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с плотной питательной среды и помещают в толстостенную стеклянную пробирку. Микробную биомассу тщательно гомогенизируют, постепенно добавляя по каплям стерильную дистиллированную воду. Густую исходную бактериальную суспензию оставляют на 15 мин для осаждения негомогенизированных конгломератов и частиц. Полученную надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой, переносят в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности (ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» Роспотребнадзора), и стандартизуют по оптическому стандарту мутности № 10 (он соответствует $1 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл), добавляя стерильную дистиллированную воду.

Суспензия, содержащая такое количество живых микробов, при контаминации ею батистовых тест-объектов, тест-поверхностей и т. п. обеспечивает требуемые (порядка $1 \cdot 10^5$–$1 \cdot 10^6$ КОЕ/см$^{-2}$) уровни их обсеменения живыми клетками тест-микроба.

Однако в связи с тем, что микобактерии могут отмирать в результате хранения или по иным причинам, а мертвые микроорганизмы, присутствующие в суспензии, будут, как и живые, давать помутнение суспензии *необходимо осуществлять бактериологический контроль фактического количества живых клеток в приготовленной суспензии,* чтобы при необходимости внести коррективы и обеспечить требуемые уровни контаминации тест-объектов жизнеспособными микобактериями.

3.4. Определение биологической концентрации тест-микроба в рабочей суспензии

Из суспензии, приготовленной по оптическому стандарту мутности № 10 (10^9 КОЕ · мл$^{-1}$), делают, как показано на рис. 1, разведения с 10-кратным шагом до 10^3 микробных клеток в 1 мл (посев 0,1 мл суспензии из этого разведения на плотную питательную среду позволяет провести достаточно точный подсчет выросших на среде колоний микобактерий, количество которых будет находиться в пределах 100 ед.).

Разведения готовят следующим образом:

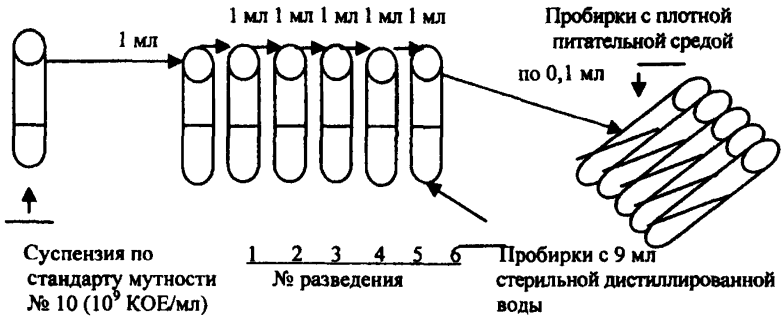


Рис. 1. Проведение эксперимента по контролю количества живых микобактерий в рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой для оценки туберкулоцидной активности ДС

Первое разведение соответствует 10^8 КОЕ/мл, а шестое –10^3 КОЕ/мл. Из этого разведения производят посев по 0,1 мл на 5 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», инкубируют в термостате при 37 °С в течение 5—7 суток. Подсчитывают количество выросших колоний на среде в пробирке, рассчитывают среднее значение из 5 и делают пересчет количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии, учитывая коэффициент разведения. Количество жизнеспособных клеток в рабочей суспензии должно быть 10^9 КОЕ/мл.

Посев суспензии в пробирки со скошенной плотной питательной средой позволяет существенно экономить расход среды и избежать пересыхания и растрескивания среды, наблюдаемых при использовании чашек Петри с плотной питательной средой.

Расчет количества жизнеспособных бактериальных клеток в приготовленной исходной суспензии осуществляют по следующей формуле:

$$X = A \cdot 10^7, \text{ где}$$

X – количество жизнеспособных бактериальных клеток в 1 мл приготовленной суспензии;

A – среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 чашках Петри;

10^7 – коэффициент пересчета, учитывающий степень разведения суспензии (10^6) и объем, использованный для посева (0,1 мл).

Например, получен рост микобактерий в 1-й пробе – 70 КОЕ, во 2-й – 130 КОЕ, в 3-й – 99 КОЕ, в 4-й – 115 КОЕ, в 5-й – 97 КОЕ, тогда среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках, будет равно:

$$A = (70 + 130 + 99 + 115 + 97) : 5 = 102$$

$X = 10^2 \cdot 10^7 = 10^9$ микробных тел в 1 мл, что соответствует оптическому стандарту мутности № 10 (1 млрд микробных тел (10^9) в 1 мл).

3.5. Методики определения устойчивости тест-микобактерий

3.5.1. Определение устойчивости тест-микобактерий к воздействию температуры

В стерильный стеклянный стакан объемом 100 мл наливают 50 мл стерильной дистиллированной воды и помещают в водяную баню. Рядом с ним в водяной бане помещают стеклянный стакан объемом 100 мл с 50 мл дистиллированной воды и с помещенным в нее термометром, позволяющим измерять температуру до 100 °С. Включают водяную баню, доводят температуру воды в стакане до 60 °С и поддерживают эту температуру на протяжении всего эксперимента.

В стерильные пробирки разливают по 5 мл стерильной дистиллированной воды комнатной температуры (количество пробирок соответствует количеству отбираемых в опыте проб). Исходя из количества проб, готовят пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая». Готовят и контаминируют тест-микроорганизмами батистовые тест-объекты (п. 5.2). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные микобактериями тест-объекты, то их заранее извлекают из холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18—20 °С).

Отсчитывают в чашке Петри необходимое для опыта количество батистовых тест-объектов (по 2 на каждую экспозицию), контаминированных тест-микобактериями, захватывают тест-объекты стерильным пинцетом все сразу и опускают их в стакан со стерильной дистиллированной водой, нагретой в водяной бане до 60 °С. Легким покачиванием емкости добиваются полного смачивания тест-объектов. В момент смачивания всех тест-объектов отмечают время.

Через каждые 15 мин стерильным пинцетом извлекают по 2 тест-объекта и опускают их в пробирку с 5 мл стерильной дистиллированной воды при температуре (20 ± 2) °С для нейтрализации действия температурного фактора. Через 5 мин каждый тест-объект помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Для контроля два контаминированных тест-микобактерией тест-объекта погружают в стерильную дистиллированную воду при температуре (20 ± 2) °С на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре 37 °С; наличие роста тест-культур проверяют через 10—14 суток.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Тест-микобактерии должны быть устойчивы к нагреванию при 60 °С не менее 1 ч.

3.5.2. Определение устойчивости тест-микобактерий к эталонным дезинфицирующим средствам

Для определения устойчивости микобактерий в качестве эталонных ДС используют монохлорамин Б, глутаровый альдегид и перекись водорода медицинскую.

Методом йодометрического титрования определяют процент активного хлора в монохлорамине Б. В опытах используют препарат, содержащий 26,0—28,0 % активного хлора, растворяя который в дистиллированной воде в соотношении 1 : 20 готовят рабочий раствор (5,0 % по препарату).

Глутаровый альдегид (зарегистрированный в России как субстанция) разводят дистиллированной водой до концентрации рабочего раствора 0,5 % (по глутаровому альдегиду).

Массовую долю перекиси водорода медицинской определяют методом перманганатометрического титрования в соответствии с ГОСТ 177—88. Готовят 4,0 %-й раствор (по перекиси водорода).

Предварительно готовят и разливают в пробирки по 5 мл стерильный раствор нейтрализатора (1,0 %-й раствор тиосульфата натрия); стерильную питьевую воду; пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая». Готовят и контаминируют тест-микобактериями батистовые тест-объекты (п. 5.2). Если в опытах используют ранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике контаминированные тест-микробом тест-объекты, то их заранее извлекают из

холодильника, чтобы они приобрели комнатную температуру (18—20 °С).

Перед постановкой опыта контролируют содержание ДВ в рабочем растворе ДС.

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

Через каждые 30 мин стерильным пинцетом извлекают по 2 тест-объекта из раствора ДС и опускают их в пробирку с 5 мл 1,0 % стерильного раствора тиосульфата натрия для нейтрализации остаточного действия ДС. Пробирку с нейтрализатором и тестами не подвергают встряхиванию. Через 5—10 мин тест-объекты переносят в пробирку с 5 мл стерильной питьевой воды. Еще через 10—15 мин каждый тест-объект помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Для контроля два контаминированных тест-микобактериями тест-объекта погружают в стерильную воду (вместо раствора ДС) на максимальный срок экспозиции, затем (как и опытные тест-объекты) их переносят в раствор нейтрализатора (тиосульфат натрия) и помещают на поверхность скошенной в пробирке плотной питательной среды.

Посевы опытные и контрольные ставят в термостат при температуре 37 °С; наличие роста тест-культур проверяют через 10—14 суток.

Опыт повторяют не менее 3 раз. Тест-микобактерии должны быть устойчивы к 5,0 %-му раствору монохлорамина не менее 2 ч; к 0,5 %-му раствору глутарового альдегида – не менее 60 мин; к 4,0 %-му раствору перекиси водорода – не менее 60 мин.

В процессе испытаний контролируют температуру раствора ДС в опыте, исходный и остаточный уровень контаминации тест-микобактериями тест-объекта (КОЕ на $см^2$), время выдержки тест-объектов в испытуемом дезинфицирующем растворе.

4. Обеспечение стандартности условий проведения исследований туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций

Для обеспечения стандартности условий постановки экспериментов необходимо провести химико-аналитический контроль исследуемых ДС и их субстанций. До проведения исследования туберкулоцидной активности ДС и их субстанций необходимо ознакомиться с рецептурой средства и техническими условиями на отечественные или спецификацией на зарубежные средства, провести химико-аналитические исследования по определению концентрации действующих веществ в средствах и определить соответствие рецептуры и других показателей, регламентированным вышеуказанными документами. При этом используют химико-аналитические методы контроля и применяют условия хранения и меры безопасности при работе со средством, предложенные производителем.

Так как для дезинфекции при туберкулезе применяют средства, обладающие действием, убивающим микобактерии, а не задерживающим их рост, при определении туберкулоцидной активности и эффективности ДС необходимо разграничить туберкулоцидное действие препарата от туберкулостатического. Для этого применяют нейтрализаторы, исключающие остаточное бактерицидное действие.

Для нейтрализации антимикробного действия дезинфицирующих средств из различных химических групп применяют следующие нейтрализаторы [2]:

- для средств из группы окислителей (хлор-, йод-, перекисьсодержащие средства; средства, содержащие надуксусную кислоту, озон) – 0,5—1,0 %-е растворы тиосульфата натрия;
- для альдегид- и фенолсодержащих средств – универсальный нейтрализатор, содержащий 3 % твина-80, 3 % сапонина, 0,1 % гистидина и 0,1 % цистеина;
- для катионных поверхностно-активных веществ – 0,1—1,0 %-е растворы сульфонола или 0,5—1,0 %-е растворы сульфонола с 10 % обезжиренным молоком;
- для композиционных средств – универсальный нейтрализатор, например, содержащий 3 % твина-80, 3 % сапонина, 0,1 % гистидина и 0,1 % цистеина. Универсальным нейтрализатором является также нейтрализующий бульон по Ди-Ингли (фирма-производитель «HIMEDIA»). В его состав входят такие ингредиенты, как гидролизат казеина, дрож-

жевой экстракт, глюкоза, натрия тиосульфат, натрия тиогликолят, натрия бисульфит, лецитин, Твин-80 и др.

Растворы нейтрализаторов готовят в асептических условиях, применяя для этого только стерильную дистиллированную воду.

При невозможности соблюдения асептических условий приготовления нейтрализаторов допускается стерилизация готовых растворов автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин.

Температура растворов нейтрализаторов должна быть 20 °С независимо от температуры окружающей среды.

Готовые растворы должны использоваться в день приготовления. Допускается хранение готовых растворов при температуре 4 °С в течение 48 ч.

Контроль полноты нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС.

Несмотря на существующие рекомендации по применению нейтрализаторов для различных действующих веществ (ДВ), многие современные ДС содержат несколько ДВ и другие вспомогательные вещества, обладающие бактериостатическим действием, и существующие (рекомендуемые) нейтрализаторы могут не обеспечивать эффективную нейтрализацию остаточного действия ДС в пробе. В этой связи результаты оценки эффективности ДС могут быть необъективными.

Поэтому каждый случай проведения испытания ДС должен предварительно сопровождаться экспериментальным контролем эффективности нейтрализации остаточного действия ДС на микробную клетку.

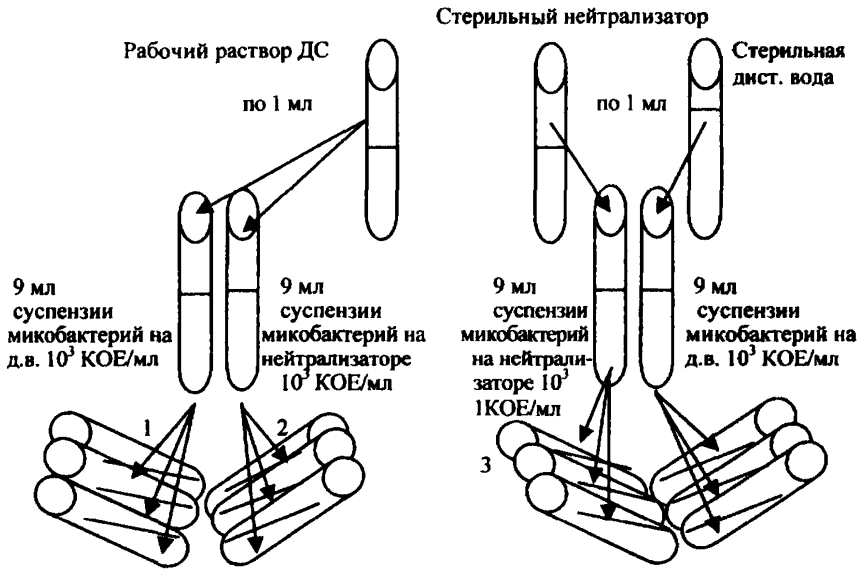
Для контроля эффективности нейтрализатора и полноты нейтрализации ДС используют суспензионный метод, предусматривающий проведение исследования, основные операции которого и их назначение приведены в табл. 2 и на рис. 2.

Таблица 2

Назначение операций эксперимента по оценке эффективности нейтрализации остаточного действия ДС

№ пробы	Назначение операции исследования	Процедура выполнения операции исследования	Ожидаемый результат
1	2	3	4
1	Контроль губительного действия ДС	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на д.в. + 1 мл раствора ДС	Рост микроорганизмов должен отсутствовать
2	Контроль полноты нейтрализации ДС	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе	Примерно одинаковое

1	2	3	4
		+ 1 мл раствора дезсредства	количество колоний в посевах проб (по 0,1 мл) на плотной питательной среде
3	Контроль отсутствия антимикробного эффекта у нейтрализатора	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на нейтрализаторе + 1 мл раствора нейтрализатора	
4	Референс-контроль количества микобактерий	к 9 мл суспензии тест-штамма (10^3 КОЕ/мл) на д.в. + 1 мл д.в.	
Примечание: спустя 5 мин после постановки опыта из каждой из четырех проб производят посев смеси по 0,1 мл как минимум на 3 пробирки со скошенной питательной средой, которые инкубируют в термостате при 37 °С, по истечении 14—21 суток учитывают результаты исследований.			



Пробирки со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая»

Рис. 2. Проведение эксперимента по контролю эффективности нейтрализации действия ДС на микобактерии используемым нейтрализатором

5. Методы исследований и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций *in vitro*

5.1. Суспензионный метод

Суспензионный метод оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций используют для получения первичной информации о концентрационных и временных параметрах эффективного (отсутствие жизнеспособных микобактерий) туберкулоцидного действия ДС. Методология выполнения эксперимента по оценке туберкулоцидной активности ДС суспензионным методом приведена на рис. 3.

Как видно из рис. 3, для проведения опыта по оценке туберкулоцидных свойств дезинфицирующего средства суспензионным методом необходимо приготовить:

- рабочую суспензию штамма тест-микобактерий с концентрацией не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (это обеспечивает возможность создания в смеси дезинфектанта с суспензией (обоснованной и применяемой для этого метода оценки ДС) концентрации микроорганизмов порядка $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл;
- пробирки со стерильной дистиллированной водой для проведения контроля реальной биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии, используемой в опыте;
- пробирки или флакон с раствором ДС в испытываемой концентрации в количестве, необходимом для обеспечения отбора всех проб;
- необходимое количество пробирок (в зависимости от количества проб, отбираемых для определения времени, обеспечивающего полную гибель тест-микроба), содержащих по 9 мл нейтрализатора, проверенного предварительно на эффективность нейтрализации остаточного действия испытываемого ДС (п. 5);
- чашки Петри со стерильной плотной питательной средой или пробирки со скошенной стерильной плотной питательной средой в количестве, необходимом для посева пробы контроля исходной суспензии и проб контроля эффективности действия ДС на тест-микроб.

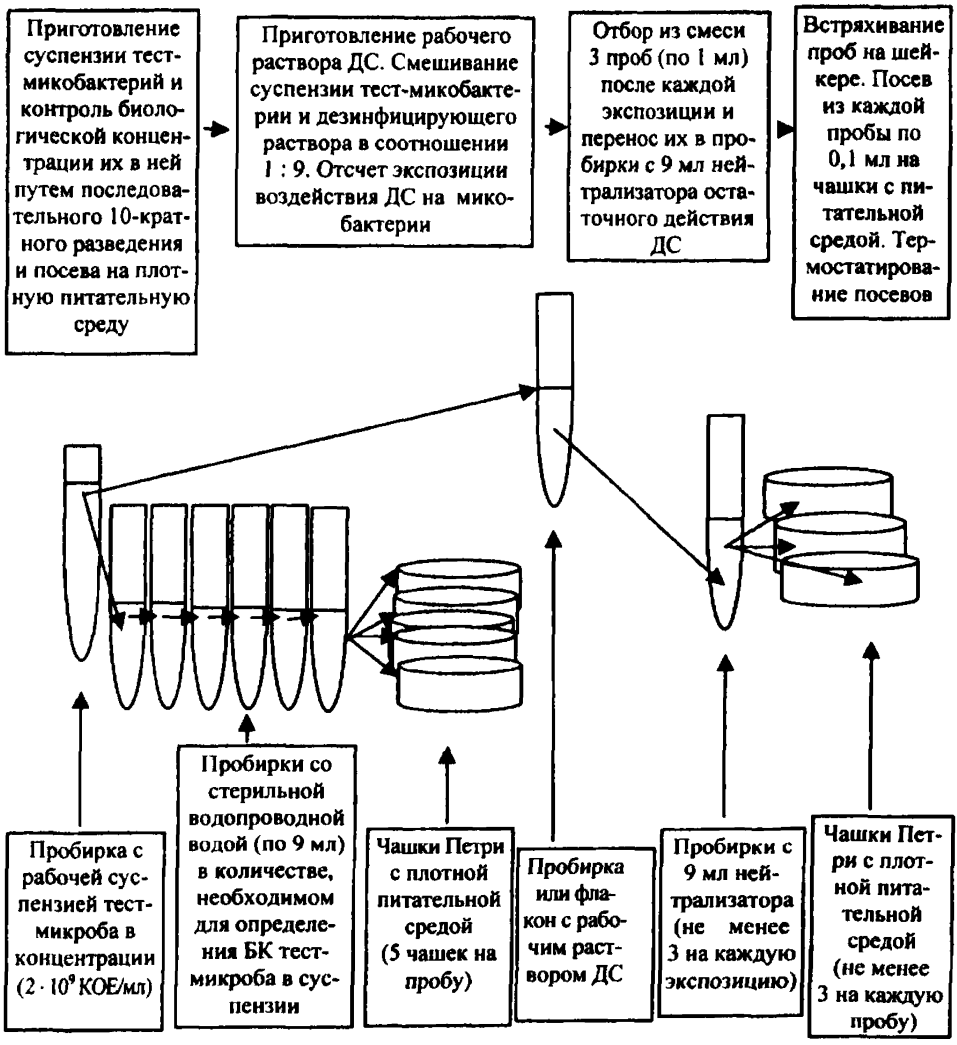


Рис. 3. Проведение эксперимента по оценке туберкулоцидной активности ДС суспензионным методом

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

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

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

• проведение контроля реальной на момент проведения опыта биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии (п. 4.3);

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

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

• по окончании каждой заданной экспозиции проведение отбора пробы в количестве 3 мл, которую по 1 мл вносят в 3 пробирки, содержащие по 9 мл стерильного раствора нейтрализатора остаточного действия дезинфицирующего средства на тест-микроорганизм;

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

• инкубирование посевов проб при температуре (37 ± 1) °С в течение 10—21 суток и учет результатов.

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

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

Средство, растворы которого обеспечивают при комнатной температуре в течение 60 мин полную гибель микобактерий, рассматривают как перспективное туберкулоцидное средство для дальнейшего изучения: оценки факторов, влияющих на туберкулоцидную активность ДС, отработки режимов эффективного применения и др.

5.2. Метод батистовых тест-объектов

Как суспензионный метод оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций, так и метод батистовых тест-объектов [5] используют для получения информации о концентрационных и временных параметрах эффективного туберкулоцидного действия ДС. В принципиальном плане методология выполнения эксперимента по оценке (тестированию) туберкулоцидной эффективности ДС методом батистовых тест-объектов приведена на рис. 4.

Как видно из рис. 4, методика эксперимента предусматривает проведение контаминации микобактериями батистовых тест-объектов, контроля исходного уровня обсеменения тест-объектов, обработки (замачивания) тест-объектов в испытываемом дезинфицирующем растворе, нейтрализации ДС после заданной экспозиции воздействия, инкубирование нейтрализованных тест-объектов на плотной питательной среде.

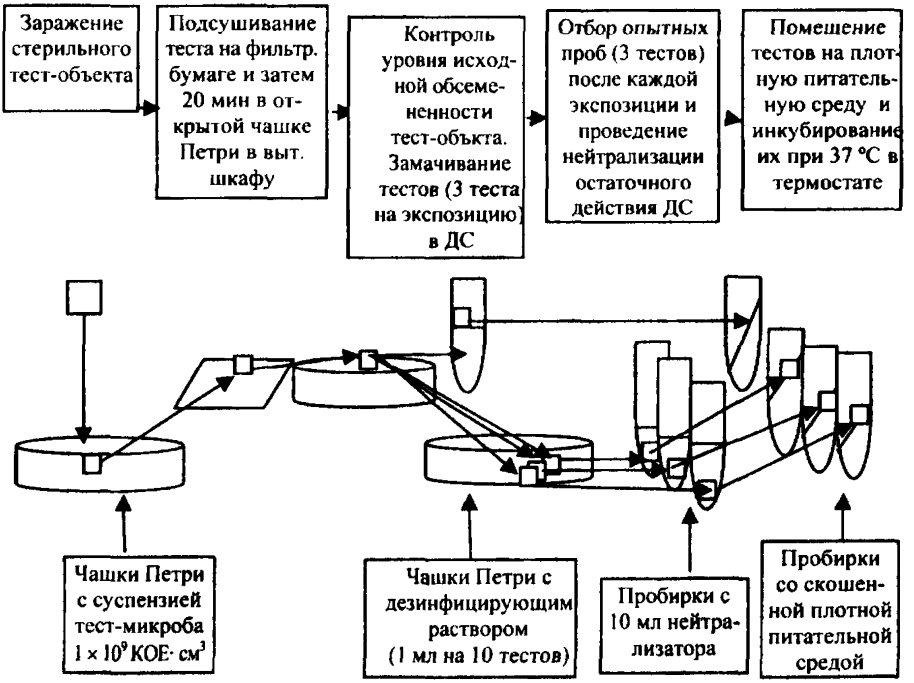


Рис. 4. Выполнение эксперимента по оценке туберкулоцидной активности дезсредства методом батистовых тест-объектов

Приготовление и контаминация батистовых тест-объектов

Батистовую ткань погружают на 24 ч в холодную питьевую воду для удаления аппрета. Затем ткань тщательно стирают с мылом, прополаскивают в холодной воде, кипятят, сушат и гладят утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске батистовой ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 10 мм друг от друга и в поперечном – на расстоянии 5 мм друг от друга. По этим линиям ткань разрезают ножницами на отдельные тест-объекты; раскладывают по 50 штук в чашки Петри, которые завертывают в бумагу и автоклавируют в паровом стерилизаторе 20 мин при 132 °С (1,1 кгс/см^2).

Приготавливают рабочую суспензию тест-микобактерий (п. 3.3) в количестве, достаточном для контаминации используемых в опыте тест-объектов (из расчета 0,2 мл на тест).

Стерильные батистовые тест-объекты (в количестве 50—100 штук) в чашке Петри заливают 10—20 мл рабочей суспензии тест-микобактерий, содержащей 10^9 КОЕ/мл, и, равномерно смачивая, оставляют тест-объекты в суспензии в закрытой чашке Петри. Через 30 мин тест-объекты, контаминированные бактериальной суспензией, стерильным пинцетом с соблюдением асептики переносят в стерильную чашку Петри на поверхность двухслойной стерильной фильтровальной бумаги, покрывают их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывают чашку. Оставляют на 10 мин с целью удаления избытка жидкости. Для фиксации микроорганизмов на батистовых тест-объектах, последние переносят на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывают стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивают в термостате при 37 °С в течение 20 мин с приоткрытыми крышками.

Хранение контаминированных тест-объектов возможно в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение суток.

Контроль исходного количества живых тест-микобактерий на тест-объекте

Для контроля количества жизнеспособных микобактериальных клеток на тест-объекте его погружают в колбу со 100 мл стерильной дистиллированной воды. Колбу устанавливают на шейкер и встряхивают в течение 30 мин для отмывания бактериальных клеток с бязевого (батистового) тест-объекта. Из полученной суспензии производят посев по 0,1 мл на 5 пробирок (5 повторностей) со средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», инкубируют в термостате при 37 °С в течение 14—21 суток. Выросшие колонии на поверхности питательной среды

подсчитывают, определяют среднее значение, производят пересчет с учетом разведения. Количество жизнеспособных бактериальных клеток в приготовленной суспензии на тест-объекте должно составлять 105—106 микробных тел. Если рост микобактерий отсутствует при посеве суспензии объемом 0,1 мл, можно увеличить объем до 0,2—0,3 мл и соответственно учесть его при расчете бактериальной концентрации на тест-объекте.

Расчет концентрации живых микобактерий на тест-объекте осуществляют по следующей формуле:

$$X = A \cdot 1\,000, \text{ где}$$

X – концентрация живых микобактерий на тест-объекте;

A – среднее количество колонии образующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках;

1 000 – коэффициент, полученный от соотношения 100 мл (общий объем пробы в колбе) к 0,1 мл (объем пробы, использованный для посева).

Например, получен рост микобактерий в 1-й пробе – 50 КОЕ, во 2-й – 110 КОЕ, в 3-й – 98 КОЕ, в 4-й – 150 КОЕ, в 5-й – 100 КОЕ, тогда среднее количество колониеобразующих единиц (КОЕ), выросших на 5 пробирках, будет равно:

$$A = (50 + 110 + 98 + 150 + 100) : 5 = 102$$

$X = 102 \cdot 1\,000 = 1\,020\,000$, что соответствует 1 млн живых микробных клеток на тест-объекте.

Проведение обработки тест-объектов раствором испытуемого ДС и контроль эффективности обеззараживания

Стерильным пинцетом погружают необходимое для проведения эксперимента количество контаминированных тест-штаммом микобактерий тест-объектов в пробирку или чашку Петри с раствором ДС (объем ДС должен рассчитываться с учетом соотношения 1,0 мл раствора на 1 тест-объект), обеспечивая полное смачивание (погружение) тест-объектов, фиксируют время начала экспозиции и следят за соблюдением температурного режима (20 ± 2) °С.

По истечении заданного времени экспозиции стерильным пинцетом извлекают тест-объект из раствора ДС и погружают его на 1—2 мин в пробирку со стерильным раствором нейтрализатора при температуре (20 ± 2) °С (пробирку с раствором нейтрализатора и погруженным в него тестом не встряхивают).

Затем при помощи пинцета размещают тест-объект на скошенную поверхность питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» (на

скошенную площадку питательной среды в пробирке можно разместить 3 тест-объекта, что позволяет увеличить без дополнительных затрат количество проб на каждую экспозицию, а значит, и достоверность результатов оценки эффективности средства). Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, помещают в термостат в наклонном положении под углом 30° таким образом, чтобы стекающий с теста посевной материал тоже равномерно распределился по поверхности питательной среды, и инкубируют при 37 °С в течение 10—14 дней с ежедневным просмотром.

Учет и анализ результатов эксперимента

Учет результатов посевов проводят визуально путем подсчета выросших колоний на самом тест-объекте и на поверхности питательной среды. Колонии *M. terrae* на среде Левенштейна-Йенсена представляют собой шероховатые и матовые выпуклые округлые образования, на среде «Новая» – гладкие и блестящие или с молочным или желтоватым оттенком.

Наличие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды показывает, что тестируемое ДС в данном режиме применения (концентрация раствора и экспозиция воздействия) не обеспечивает надежного туберкулоцидного эффекта.

Отсутствие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды свидетельствует о наличии у средства в данном режиме (концентрация раствора и экспозиция воздействия) туберкулоцидной эффективности, отвечающей предъявляемым требованиям к ДС для практического их использования (обеспечение снижения уровня обсемененности объекта на 10^5 КОЕ/см^2).

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

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

Средство, растворы которого обеспечивают при температуре (20 ± 2) °С в течение 60 мин полную гибель микобактерий тест-микроорганизма, может рассматриваться как перспективное туберкулоцидное ДС для дальнейшего изучения: оценки факторов, влияющих на туберкулоцидную активность ДС, отработки режимов эффективного применения и др.

5.3. Методы изучения факторов, влияющих на туберкулоцидную активность дезинфицирующих средств и их субстанций

Для определения условий применения и направлений дальнейших исследований необходимо изучить зависимость туберкулоцидного действия от температуры раствора ДС, величины pH и присутствия белковых загрязнений.

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

На основании полученных данных определяют целесообразность и направления дальнейших исследований препарата для применения в качестве ДС.

Определение влияния температуры на туберкулоцидную активность ДС и их субстанций проводят с целью выявления возможности использования подогретых растворов ДС для сокращения времени обеззараживания объектов в отношении микобактерий туберкулеза, а также для оценки эффективности туберкулоцидных свойств при пониженных температурах окружающей среды, обеззараживаемого объекта и самого раствора ДС.

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

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

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

Через определенные промежутки времени из каждой колбы извлекают по 2 тест-объекта и помещают их при температуре (20 ± 1) °С в пробирки с соответствующим нейтрализатором на 5 мин, затем во вторые пробирки со стерильной водой на 5 мин и только после этого каждый тест-объект переносят в пробирку со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» и укладывают его на поверхность среды. Посевы инкубируют в течение 48—72 ч при

(37 ± 1) °С. Контролем служат по 2 тест-объекта при каждой исследованной температуре, не подвергавшиеся действию испытуемого ДС, но погруженные в пробирки со стерильной водопроводной (питьевой) водой на срок, равный действию испытуемого ДС.

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

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

Исследование проводят методом батистовых тест-объектов (п. 5.2), только для контаминации тест-объектов используют суспензию тест-микобактерий, содержащую 20,0 % инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови, которые добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию нормальной сыворотки крупного рогатого скота проводят дробным трехкратным прогреванием на водяной бане при температуре (60 ± 1) °С в течение 30 мин. Если активность препарата не снижается в присутствии 20,0 % белка, концентрацию инактивированной сыворотки крупного рогатого скота или дефибринированной крови в суспензии тест-микроорганизма увеличивают до 40,0 %. Отсутствие снижения туберкулоцидной активности ДС при добавлении 40,0 % сыворотки позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

6. Методы изучения туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания объектов внешней среды

Многообразие факторов передачи туберкулеза и длительная выживаемость возбудителей туберкулеза и микобактериозов во внешней среде обосновывает необходимость обеззараживания большого перечня

объектов, которые могут быть контаминированы возбудителями в инфекционном очаге на дому, в лечебно-профилактических учреждениях, в специализированных бактериологических лабораториях, работающих с этими возбудителями.

Учитывая вышесказанное, перечень тест-объектов, моделирующих объекты, подлежащие дезинфекции, включает: поверхности помещений, мебели, аппаратов, приборов, санитарно-технического оборудования, транспортных средств и др.; изделия медицинского назначения, в т. ч. эндоскопы; предметы ухода за больными, игрушки; посуду, включая лабораторную и из-под выделений; белье, одежду, спецодежду и другие объекты из тканей; изделия из резины, в т. ч. перчатки, сапоги, фартуки и др.; обувь; руки в резиновых перчатках; остатки пищи; выделения: фекалии, мочу, кровь, мокроту; воду; воздух; медицинские отходы.

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

В исследованиях используют тест-поверхности (10 × 10 см) из различных материалов: дерева (неокрашенного, окрашенного масляной, клеевой или другими красками, оклеенного обоями), линолеума, пластика, кафеля, фаянса, плитки, металлов, стекла.

Тест-поверхности из различных материалов (за исключением деревянных тест-поверхностей, окрашенных клеевой краской и оклеенных обоями) тщательно моют водой с мылом и щеткой, стерилизуют в паровом стерилизаторе (при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин). Тест-поверхности, окрашенные клеевой краской и оклеенные обоями, протирают несколько раз стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной питьевой водой. Готовят суспензию тест-микобактерий, содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. При разработке режимов обеззараживания раковин, ванн и других загрязненных объектов для имитации органического загрязнения к суспензии добавляют 40,0 % лошадиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин (к 6 мл 2-миллиардной суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

После подсыхания тест-поверхности располагают горизонтально и на них с помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки наносят 0,5 мл суспензии тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по тест-поверхности (100 $см^2$) сте-

рильным стеклянным шпателем. Если суспензия тест-микроорганизма не распределяется равномерно, а собирается в каплю, растирание шпателем по тест-поверхности осуществляют неоднократно (3—5 раз). Контаминированные тест-поверхности подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (30—120 мин). Обеззараживание тест-поверхностей осуществляют способами протирания, орошения или мытья дезинфицирующим раствором.

При обеззараживании тест-поверхности из дерева (окрашенные клеевой и другими красками, оклеенные обоями), стекла, кафеля и т. п. располагают вертикально; поверхности из линолеума, метлахской плитки и других покрытий для пола располагают горизонтально. Тест-поверхности обеззараживают путем их орошения, протирания (однократного или двукратного) дезинфицирующим раствором.

В зависимости от вида обрабатываемой поверхности и наличия загрязнений на ней, норма расхода ДС на одну обработку способом протирания составляет 100—150 мл на м^2 (1—1,5 мл на 100 см^2), способом орошения – 150 мл на м^2 (1,5 мл на 100 см^2) при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 мл на м^2 (3 мл на 100 см^2) при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом.

При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5—15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени (15—30—60 и т. д. до 120 мин) с тест-поверхностей делают смывы путем тщательного протирания поверхности стерильной марлевой салфеткой (5 см^2), увлажненной нейтрализатором. После протирания на тест-поверхности не должно оставаться излишней влаги. Салфетки погружают на 5 мин в пробирки (емкости) с соответствующим нейтрализатором (10 мл), а затем в стерильную питьевую воду с бусами и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Полученную смывную жидкость вносят по 0,1 мл в 3—5 пробирок со скошенной плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», тщательно распределяя ее по всей поверхности. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 10—21 суток.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных тест-поверхностей вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду из того же расчета, что и опытные. Жидкость, в которую помещают стерильную марлевую салфетку после взятия смыва с контрольных поверхностей, перед посевом разводят в 100 раз и вносят по 0,1 мл на скошенную поверхность плотной питательной среды Левен-

штейна-Йенсена или «Новая» 3—5 пробирок. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Учитывают результаты через 10—21 суток.

Оценку результатов проводят по посеву того разведения, в котором число колоний на чашке Петри или в пробирке составляет от 30 до 300.

После выдерживания посевов в термостате подсчитывают число колоний на чашках или пробирках с плотной питательной средой, рассчитывают остаточную плотность контаминации на 100 $см^2$ тест-поверхности и высчитывают эффективность обеззараживания, принимая количество тест-микроорганизмов, снятых с контрольных тест-объектов (тест-поверхностей), за 100 %.

Например, на 100 $см^2$ контрольной тест-поверхности по результатам бактериологического контроля обнаружено 148 000 микробных клеток, а на аналогичного вида опытной тест-поверхности – 20 микробных клеток.

$$148\,000 - 100\ \% \qquad x = 20 \cdot 100 : 148\,000 = 2 : 148 = 0{,}013\ \%$$
$$20 - x$$

Эффективность обеззараживания опытной тест-поверхности составляет:

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

Критерий эффективности ДС при обеззараживании тест-поверхностей из различных материалов, контаминированных тест-микроорганизмом, равен не менее 99,99 %.

6.2. Обеззараживание предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких)

В исследованиях используют тест-объекты (100 $см^2$) и предметы ухода за больными из различных материалов: резин на основе натурального и силиконового каучука (медицинская клеенка, грелка, груша); стекла (поильник; плевательница; градусник); пластмасс (грелка, лоток; наконечник для клизм); металлов (таз, стакан для термометра); игрушки (кроме мягких) из резин и пластмасс.

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

Готовят суспензию тест-микобактерий, содержащую $2{,}0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. При наличии у средства фиксирующих свойств к суспензии добавляют 40,0 % лошадиной сыворотки, инактивированной при 56 °С в

течение 30 мин (к 6 мл 2-миллиардной суспензии прибавляют 4 мл сыворотки).

С помощью одноканального механического дозатора или стеклянной пипетки на поверхность тест-объекта, предмета ухода за больными, игрушки наносят 0,5 мл суспензии тест-микроорганизма. Суспензию равномерно распределяют по поверхности (100 $см^2$) стерильным стеклянным шпателем. Каналы и полости предмета ухода за больными, игрушек заполняют с помощью шприца. Мелкие игрушки полностью погружают в суспензию. Контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания (60—120 мин).

Растворы ДС готовят на водопроводной воде при температуре (20 ± 2) °С. Обеззараживание осуществляют способом погружения, протирания, орошения. После подсушивания контаминированные тест-объекты, предметы ухода за больными, игрушки, в т. ч. имеющие каналы и полости, погружают в раствор испытуемого ДС или протирают салфеткой, смоченной им. Мелкие игрушки полностью погружают в емкость с раствором ДС, препятствуя их всплытию; крупные игрушки обеззараживают способом орошения. Норма расхода ДС способом протирания из расчета 100—150 мл/$м^2$ при однократной обработке и 200—300 мл/$м^2$ при двукратной; способом орошения – 150 мл/$м^2$ при обработке распылителем типа «Квазар» и 300 мл/$м^2$ при обработке распылителем типа «Автомакс» или гидропультом. При необходимости обработку способом протирания или орошения повторяют через 5—15 мин.

Для контроля эффективности обеззараживания через определенные промежутки времени после обработки (30—60—120 мин) тест-объекты, предметы ухода за больными и игрушки извлекают из раствора, делают смывы стерильной марлевой салфеткой (5 $см^2$), увлажненной нейтрализатором. Салфетки погружают в стерильный раствор нейтрализатора на 5 мин, затем переносят в пробирки (емкости) с бусами и стерильной питьевой водой (10 мл) и встряхивают на шейкере в течение 10 мин. Каналы и полости промывают нейтрализатором (10 мл), который собирают в стерильные пробирки (емкости) и оставляют на 10 мин для нейтрализации.

Полученную смывную жидкость и смывную жидкость из каналов вносят по 0,1 мл на скошенную поверхность плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» 3—5 пробирок. В контрольных опытах вместо раствора ДС используют стерильную питьевую воду.

Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

Результаты учитывают через 10—21 сутки инкубирования.

Эффективность ДС при обеззараживании тест-объектов, предметов ухода за больными и игрушек из различных материалов (кроме мягких), контаминированных тест-микроорганизмом, должна быть не менее 100 %.

6.3. Обеззараживание посуды столовой, лабораторной и из-под выделений

Для определения туберкулоцидной активности ДС, предназначенных для обеззараживания посуды, в качестве тест-объектов используют набор столовой и чайной посуды: тарелки, стаканы, кружки из различного материала (фарфор, фаянс, алюминий, стекло, пластик, посуда, покрытая эмалью); столовые приборы: ножи, вилки, ложки из различного материала (нержавеющая сталь, алюминий, пластик), посуду одноразового использования и набор лабораторной посуды, представляющий тест-объекты из стекла и пластмасс (предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, планшеты для иммунологического анализа и др.); посуду из-под выделений (мочеприемники, подкладные судна). Перед экспериментом посуду и столовые приборы моют водой с мылом и щеткой и высушивают.

На посуду (площадь в 100 $см^2$) пипеткой наносят суспензию тест-микроорганизма из расчета 0,5 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ в 1 мл. Суспензию тест-микроорганизма равномерно распределяют по поверхности посуды стеклянным шпателем. Столовые приборы для контаминации погружают в бактериальную суспензию на 1—2 мин, оставляя незараженными их ручки. Контаминированную посуду подсушивают (до полного высыхания) при комнатной температуре (60—120 мин) и относительной влажности воздуха 50—60 %.

Для разработки режимов обеззараживания посуды с остатками пищи при контаминации используют суспензию тест-микроорганизма, смешанную с овсяной, манной или другой кашей, сваренной на молоке со сливочным маслом (к 10 г каши добавляют 1 мл 2-миллиардной микробной взвеси). Для имитации загрязнения чайной посуды используют кисель (к 10 г киселя добавляют 1 мл 2-миллиардной микробной взвеси), лабораторной посуды – 40,0 %-ю инактивированную сыворотку, посуды из-под выделений – 20,0 %-ю эмульсию фекалий, предварительно растертую в ступке.

Обработку столовой, чайной, лабораторной посуды, столовых приборов проводят способом погружения в дезинфицирующий раствор.

Растворы готовят на питьевой воде. Температура испытуемого раствора 18—20 °С. При необходимости изучают эффективность растворов ДС при температуре 50 °С.

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

Через определенные интервалы времени (например 15, 30, 60 мин и т. д.) извлекают по одному предмету разных наименований (например, тарелка, стакан, предметное стекло, нож и т. д.) из дезинфицирующего раствора и стерильной марлевой салфеткой (5 $см^2$), смоченной в растворе нейтрализатора, соответствующего данному ДС, тщательно протирают зараженную часть каждого предмета и погружают в 10 мл этого же нейтрализатора на 5 мин, затем салфетку переносят в пробирку со стерильной питьевой водой и бусами. Время отмыва марлевой салфетки – 10 мин при постоянном встряхивании на шейкере. После отмыва смывную жидкость по 0,1 мл высевают в 3—5 пробирок со скошенной поверхностью плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» (по 0,1 мл в каждую). Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С. Предварительный учет результатов проводят через 10—14 суток, окончательный – через 21 сутки.

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

Критерий эффективности обеззараживания посуды: гибель тест-микроорганизма не менее (100 %).

6.4. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания изделий медицинского назначения (ИМН), включая эндоскопы

6.4.1. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания ИМН из различных материалов (кроме эндоскопов)

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

части, каналы и полости, имеющие насечки и напыления, изделия извитой формы; изделия, изготовленные из нескольких видов материалов и т. д.).

На рабочую поверхность тест-изделия (у замковых изделий – также в область замка, а при наличии каналов и полостей – также в канал изделия) наносят 0,1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл тест-микроорганизма, содержащей 40 % инактивированной лошадиной сыворотки. Мелкие тест-изделия для контаминации погружают в эту суспензию на 15 мин. Контаминированные тест-изделия подсушивают в термостате в течение 20—25 мин. Дезинфицирующие растворы готовят на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до (50 ± 1) °С.

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

Через определенное время (от 15 до 120 мин) изделия извлекают из раствора и марлевой салфеткой размером 5 × 5 см, пропитанной нейтрализатором, с поверхности изделия делают смывы, салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же нейтрализатора на 5 мин, затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой водой и встряхивают с бусами в течение 5—10 мин. Для контроля эффективности обеззараживания делают посев смывной жидкости по 0,1 мл на поверхность агаровой питательной среды, а салфетку помещают в бульон. Канал изделия промывают нейтрализатором, и смывную жидкость засевают по 0,1 мл на скошенную плотную питательную среду в 3—5 пробирок. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 21 суток. Учет предварительных результатов проводят через 10—14 суток и окончательных – через 21 сутки.

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

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

6.4.2. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания эндоскопов

В качестве тест-объектов используют фрагменты эндоскопа или эндоскоп (гибкий – гастроскоп, жесткий – цистоскоп). По 0,1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл тест-микроорганизмов, наносят с помощью пипетки на наружную поверхность и в канал эндоскопа, подсушивают в течение 20 мин. Затем контаминированное изделие погружают в раствор ДС, заполняя полости и каналы эндоскопа. Через определенное время (от 15 до 60 мин) изделие извлекают из раствора и делают смыв с наружной поверхности марлевой салфеткой (5 × 5 см), смоченной в растворе нейтрализатора; салфетку помещают в пробирку с 10 мл того же стерильного раствора нейтрализатора на 5 мин, а затем переносят ее в пробирку со стерильной питьевой водой и встряхивают с бусами в течение 5—10 мин. Канал изделия промывают раствором нейтрализатора и смывную жидкость засевают на питательный агар. Проводят также контроль микробной обсемененности использованных для отмыва проб раствора нейтрализатора и питьевой воды. Кратность постановки эксперимента должна быть достаточной для получения статистически достоверных результатов.

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

Положительной считается проба, показывающая характерный рост тест-микроорганизма на плотных питательных средах или обнаружение тест-микроорганизма в растворе применявшегося нейтрализатора.

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

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

6.4.3. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств для дезинфекции высокого уровня (ДВУ) эндоскопов

Данная методика предназначена для разработки режимов ДВУ эндоскопов при проведении «нестерильных» диагностических и лечебных манипуляций.

Для исследования выбирают ДС, обладающее спороцидным действием, и испытания его проводят при тех же условиях (концентрация, температура), которые обеспечивают гибель спор бацилл, определяя необходимое время дезинфекционной выдержки для достижения гибели наиболее устойчивого к изучаемому ДС микроорганизма.

При определении эффективности средств для ДВУ эндоскопов в качестве тест-объектов используют фрагменты канала гибкого эндоскопа или его имитаторы в виде трубок из пластика длиной 2 см, диаметром 2 мм.

Стерильные тест-объекты искусственно контаминируют, нанося с помощью дозатора/микропипетки в центральную часть канала и на поверхность каждой трубки суспензию тест-микроорганизма из расчета 10^6 микробных клеток тест-микобактерий на каждое изделие. Для имитации органического загрязнения к суспензии микроорганизмов перед контаминацией объекта добавляют 2 % инактивированной лошадиной сыворотки.

Контаминированные тест-объекты подсушивают при комнатной температуре 18—22 °С в течение 20 мин.

Дезинфицирующий раствор готовят на стерильной водопроводной (питьевой) воде. Обработку исследуемым ДС осуществляют способом погружения в испытуемый дезинфицирующий раствор. Через определенные интервалы времени, зависящие от химического состава средства (в промежутке от 5 до 60 мин), тест-изделия извлекают из дезинфицирующего раствора, помещают на 5—10 мин в раствор соответствующего нейтрализатора (раздел 4). После отмыва смывную жидкость по 0,1 мл высевают в 3—5 пробирок со скошенной питательной средой для проверки эффективности обеззараживания.

Посевы выдерживают в термостате при температуре и времени, оптимальных для роста использованного тест-микроорганизма: для тест-микобактерий – 37 °С 21 сутки, после чего проводят учет результатов эксперимента.

В качестве контроля используют тест-объекты, контаминированные как указано выше и помещенные в воду на время дезинфекционной выдержки.

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

Эффективным считают режим (концентрация–время–температура), обеспечивающий гибель тест-микроорганизма на всех тест-изделиях при отсутствии его роста в питательной среде. Положительной считается проба с характерным ростом микроорганизма на плотной питательной среде или обнаружение микроорганизмов в растворе применявшегося нейтрализатора. При наличии положительных проб эксперимент повторяют, увеличивая время воздействия, но не более чем до 60 мин.

При необходимости эффективность разработанного режима проверяется в практических условиях.

Критерий эффективности обеззараживания – 100 % гибель тест-микроорганизма.

Время обеззараживания – не более 60 мин.

6.5. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани

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

Оценку эффективности ДС для обеззараживания белья, одежды, спецодежды и других объектов из ткани осуществляют с помощью стерильных тест-объектов, представляющих собой кусочки бязи размером 2 × 2 см. Бязь предварительно готовят и обеззараживают так же, как батист. Контаминируют стерильные тест-объекты суспензией тест-микроорганизмов, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, из расчета 20 мл на 10 тест-объектов, и подсушивают в течение 30 мин. Затем тест-объекты закладывают в бязевые мешочки размером 5 × 8 см (по 2 штуки в каждый), которые закрывают в виде конверта.

Раствор испытываемого ДС на питьевой воде комнатной температуры или подогретой до (50 ± 1) °С готовят из расчета 5 л на 1 кг белья. Ветошь, имитирующую белье, поштучно погружают в емкость с раствором испытываемого ДС так, чтобы между слоями ткани не образовывалось воздушных прослоек, препятствующих процессу обеззараживания. Одновременно между слоями белья распределяют (сверху, в середине и

внизу) мешочки с контаминированными тест-объектами. Через заданное время мешочки извлекают одновременно из трех слоев. Тест-объекты вынимают из мешочка стерильным пинцетом, помещают на 5 мин в пробирки с раствором соответствующего нейтрализатора, затем переносят в стерильную питьевую воду и высевают на питательный агар. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С. Предварительный учет результатов проводят через 10—14 суток, а окончательный – через 21 сутки. В контрольных опытах белье погружают в стерильную питьевую воду. Мешочки с тестами закладывают так же, как и в опыте. При получении 100 % гибели тест-микроорганизма в опытах по обеззараживанию белья без белковых загрязнений переходят к опытам по обеззараживанию белья, загрязненного выделениями.

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

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

При изучении эффективности обеззараживания изделий из синтетических тканей (капрон, ацетат, лавсан и др.) используют тест-объекты из этих тканей размером 5 × 5 см, т. к. микроорганизмы не проникают в структуру этих тканей и смываемость их в 2 раза больше, чем с бязевых тест-объектов.

6.6. Исследование туберкулоцидной эффективности камерного метода обеззараживания

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

В качестве тест-микроорганизма используют *Mycobacterium* B_5 в виде суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ в 1 мл, которой контаминируют тест-объекты из батиста, бязи и других материалов, соответствующих обеззараживаемым объектам. Тест-объекты закладывают в стерильные конверты из хлопчатобумажной ткани (по 2 тест-объекта в конверт). Пронумерованные тест-объекты помещают в хлопчатобумажные мешочки с максимальными термометрами и размещают в толще объектов в контрольные точки камеры на трех уровнях.

После обеззараживания мешочки извлекают из камеры и записывают показания максимальных термометров. Тест-объекты помещают в пробирки с 5 мл картофельно-глицеринового бульона.

Инкубирование посевов с тест-объектами проводят при температуре (37 ± 1) °С в течение 10—21 суток. Отсутствие помутнения питательной среды указывает на гибель микобактерий в тест-объектах. При наличии роста проводят сравнение выделенной культуры с тест-микобактерией.

В качестве контроля используют тест-объекты, которые не помещали в камеру, и питательную среду, которую применяли для культивирования тест-микроорганизма после обработки. Контрольные тест-объекты и среду проверяют аналогично тест-объектам, которые обрабатывали в камере. Для установления эффективности обработки проводят не менее трех экспериментов на каждое время обработки.

Критерием эффективности обеззараживания вещей в дезинфекционных камерах является 100 % гибели *Mycobacterium* B_5 на использованных тест-объектах.

6.7. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств при обеззараживании рук в резиновых перчатках

В качестве тест-микроорганизма используют суспензию *M. terrae*, содержащую $(1{,}0—5{,}0) \cdot 10^8$ КОЕ/мл, которую разводят до содержания 10^7, 10^5 и 10^3 КОЕ/мл.

Для устранения посторонней микрофлоры руки, включая запястья и предплечья, испытатели тщательно моют с мылом в теплой проточной

воде, затем протирают стерильной марлевой салфеткой и надевают резиновые перчатки.

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

Для обеззараживания поверхности перчаток в сжатую ладонь руки в печатке испытателю-добровольцу наносят 2,5 мл исследуемого ДС. Затем он в течение 10—15 сек протирает этой порцией дезинфицирующего раствора поверхность перчаток обеих рук, совершая движения рук, которые выполняют при обработке кожи рук антисептиком. После этого такую же операцию проводят, нанося 2,5 мл дезинфицирующего раствора на ладонь второй руки и засекают по секундомеру начало экспозиции.

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

Эффективным считают режим применения ДС, обеспечивающий 100 % гибель тест-микроорганизма на резиновых перчатках, защищающих кожу рук.

6.8. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания выделений (моча, кал, мокрота) и крови

Обеззараживание мочи. Мочу разливают в колбы или пробирки по 8 мл, добавляют 1 мл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл *M. terrae*, и 1 мл инактивированной лошадиной сыворотки.

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

Испытуемые растворы ДС добавляют к моче в равном или двойном объеме. Отмечают время контакта и через интервалы 15, 30, 60 мин смесь в количестве 1 мл пипеткой переносят в пробирки с 5 мл соответствующего нейтрализатора. После тщательного смешивания 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку с 5 мл нейтрализатора и затем засевают по 0,1 мл в пробирки на скошенную поверхность питательной среды, как из первой, так и из второй пробирки. Посевы инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С.

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

Ориентировочный учет результатов проводят через 10—14 суток, окончательный – через 21 сутки. Результаты опытов учитывают по отношению к контролю, который принимают за 100 %. Окончательное заключение об эффективности ДС делают на основании не менее трех опытов с совпадающими результатами.

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

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

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

Для приготовления 20 %-й эмульсии 20 г кала растирают в ступке и добавляют 80 мл воды; полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли, стерилизуют в автоклаве, разливают пипеткой в пробирки по 9 мл и добавляют по 1 мл $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в суспензии *M. terrae*. Опыты начинают ставить с концентрации, вызывающей гибель тест-микроорганизма в моче с белком через 30 мин. Приготовленную эмульсию фекалий заливают равным или двойным объемом дезинфицирующего раствора и через определенные интервалы времени производят высевы так же, как и при обеззараживании мочи. Результаты учитывают через 21 сутки.

При положительных результатах проводят опыты с большим количеством оформленных фекалий (200—250 г). Для этого помещают их в

сосуд, заливают дезинфицирующим раствором или засыпают сухими ДС в равном или двойном количестве по отношению к весу фекалий, определяют происходит ли гомогенизация фекалий. Затем небольшую часть каловых масс перемешивают стеклянной палочкой с жидкостью, а остальную массу оставляют в виде небольших комочков. Через определенные промежутки времени (например 30, 60 мин) проводят посев.

Посев жидкой части фекалий производят так же, как в опытах с мочой. Плотные же части (комочки) забирают бактериологической петлей и помещают в 5 мл соответствующего нейтрализатора, растерев их о края пробирки и тщательно перемешав. Затем стерильной пипеткой переносят из этой пробирки 1 мл смеси во вторую пробирку, тоже содержащую нейтрализатор. Как из первой, так и из второй пробирки производят посев по 0,1 мл на скошенную поверхность питательной среды в пробирках (не менее чем в три пробирки). Окончательный результат учитывают через 21 сутки, а предварительный – через 10—14 суток.

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

Обеззараживание крови и мокроты. В качестве тест-объектов при оценке туберкулоцидной эффективности ДС, предназначенных для обеззараживания крови, используют кровь, а мокроты – куриный белок. Для контаминации тест-объектов тест-микроорганизмом к 9 мл 40 % крови или 50 % куриного белка добавляют по 1 мл суспензии тест-микроорганизма, содержащей 2×10^9 КОЕ/мл, перемешивают и разливают по 1 мл в стерильные флаконы. Затем во флаконы засыпают или наливают исследуемое ДС в объемных (5 %, 10 % и т. д.) соотношениях к исследуемому материалу. Через определенные промежутки времени (1 ч, 2 ч и т. д.) с помощью стерильной бактериологической петли производят отбор пробы смеси и переносят ее в 5 мл нейтрализатора для нейтрализации остаточного действия ДС на тест-микроорганизм. По истечении 5 мин из этой пробирки с помощью пипетки производят высев по 0,2 мл исследуемой пробы на скошенную поверхность питательной среды в пробирках. Пробирки с посевами инкубируют при (37 ± 1) °С.

Предварительный результат роста тест-микроорганизмов на чашках учитывают через 10—14 суток, а окончательный – через 21 сутки.

Эффективными считают средство и режим, обеспечивающие 100 % гибель *M. terrae* в обеззараживаемом материале.

6.9. Исследование туберкулоцидной эффективности дезинфицирующих средств, предназначенных для обеззараживания медицинских отходов

При изучении туберкулоцидной активности ДС с целью разработки режимов обеззараживания медицинских отходов используют тест-объекты из резин, пластмасс, текстильных материалов, стекла, металлов. Для приготовления тест-объектов стерильные одноразовые изделия медицинского назначения (бинты, ватные тампоны, фрагменты систем для переливания крови и лекарственных препаратов, катетеры, шпатели, шприцы, иглы, перчатки, одноразовое белье, салфетки, пипетки, трубки и пр.) измельчают и погружают в суспензию тест-микроорганизма, содержащую $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл с добавлением 40 %-й инактивированной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. После достаточного пропитывания объекты извлекают в сухую стерильную емкость и подсушивают в термостате при 37 °С в течение 20 мин или при комнатной температуре 18—20 °С и относительной влажности воздуха 50—60 % в течение 1 ч.

Контаминированные тест-объекты погружают в емкость с испытуемым дезинфицирующим раствором так, чтобы он полностью закрывал их. Контроль эффективности обеззараживания объектов проводят через каждые 15—30 мин в течение времени до 360 мин. Для этого тесты из различных материалов (по два каждого наименования) извлекают из дезинфицирующего раствора, промывают в растворе соответствующего нейтрализатора, из полученных смывов производят посев по 0,1 мл на поверхность твердой питательной среды. Контрольные тест-объекты погружают в стерильную водопроводную воду на срок максимальной экспозиции, а затем высевают на скошенную поверхность питательной среды. Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Окончательный учет результатов проводят на 21-е сутки.

Критерий эффективности обеззараживания медицинских отходов – 100 % гибель *M. terrae* на тест-объектах, обработанных ДС.

6.10. Методы определения туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств при обеззараживании воздуха

Химические ДС применяют для обеззараживания воздуха в помещениях в виде аэрозолей или паров растворов ДС, а также газов.

При исследовании эффективности обеззараживания воздуха химическими ДС с целью разработки режима его применения при туберкулезе в качестве тест-микроорганизмов используют *M. terrae*.

Исследования проводят в испытательных камерах объемом 1 или 2 $м^3$. Предварительно внутреннюю поверхность камеры моют раствором моющего средства, остатки которого затем смывают водопроводной водой и включают бактерицидный УФ-облучатель. В центре камеры располагают продезинфицированный вентилятор, производительностью 15—25 $м^3$/ч, назначение которого – предотвращение быстрого оседания микроорганизмов.

Для определения эффективности обеззараживания воздуха используют аспирационный метод.

В камере распыляют суспензию тест-микроорганизма в количестве, достаточном для создания в воздухе камеры концентрации микроорганизмов $2,1 \times 10^4$ КОЕ/$м^3$ (определяется опытным путем).

Аэрозоль дезинфицирующего средства создают с помощью распыливающей аппаратуры, которая обеспечивает образование в воздухе не менее 80 % частиц с дисперсностью 10—15 мкм, и включают вентилятор. Затем в камере распыляют раствор исследуемого средства и через определенные промежутки времени проверяют обсемененность воздуха.

Аспирационный метод основан на аспирации воздуха через жидкость. При использовании аспирационного метода для оценки эффективности обеззараживания воздуха необходимо следующее оборудование:

- воздуходувка с производительностью 15—25 л/мин;
- стерильные склянки Дрекселя с 50 мл стерильной водопроводной воды из расчета 2 штуки на 1 пробу. Предварительно в стерильную воду вносят нейтрализатор, соответствующий испытуемому ДС;
- трубка диаметром 8—10 мм, длиной 50—60 см, которая вводится в камеру для забора проб воздуха в центре камеры;
- стерильные резиновые шланги, соединяющие склянки Дрекселя (последовательно одну за другой) и далее с воздуходувкой.

Подготовка камеры к эксперименту осуществляется, как указано выше. На исследование отбирается 50 л воздуха (объем пробы).

Последовательность отбора проб следующая:

1) проведение контроля обсемененности воздуха до начала распыления суспензии тест-микроорганизмов;

2) проведение контроля обсемененности воздуха после распыления суспензии тест-культуры;

3) проведение контроля эффективности обеззараживания воздуха – отбор проб через каждые 5—10 мин в зависимости от предполагаемой эффективности ДС.

После отбора проб жидкость из 2 склянок Дрекселя смешивают и по 1 мл вносят в пробирки со скошенной питательной средой. Посевы помещают в термостат. Предварительный учет результатов проводят через 10—14 суток, окончательный – через 21 сутки.

Критерий эффективности обеззараживания воздуха – 100 % гибель *M. terrae*.

7. Методы исследования и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств в практических условиях

Практические испытания проводятся в тех случаях, когда ДС содержит новое действующее вещество и требуется подтверждение эффективности разработанных в лабораторных условиях режимов в отношении возбудителей туберкулеза и микобактериозов.

Испытания проводят в соответствии с инструкцией по испытанию ДС, оценивая туберкулоцидную эффективность, безопасность применения и надежность рекомендованных мер предосторожности, физико-химические качества ДС: растворимость, запах, наличие моющего действия и пр.

При оценке эффективности ДС предварительно оценивают обсемененность объектов окружающей среды, имеющих эпидемиологическое значение при туберкулезе, до проведения дезинфекции (фон) и сравнивают ее с обсемененностью этих объектов после обработки рабочим раствором ДС.

Эффективным считают средство, после обработки которым в соответствии с режимом, указанным в инструкции, на объектах не обнаруживают возбудителей туберкулеза, микобактериозов и *S. aureus*.

По завершении испытаний оформляется акт испытаний, в котором отражаются указанные выше параметры и другие отмеченные свойства.

8. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

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

3. «Нормативные показатели безопасности и эффективности дезинфекционных средств, подлежащих контролю при проведении обязательной сертификации» № 01-12/75—97.

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

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

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

7. СП 1.3.232—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

8. Стандарт Европейского комитета по стандартизации NEN-EN 14476.

Приложение 1

Характеристика тест-микроорганизмов по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам

Mycobacterium B_5 используют для оценки эффективности камерного обеззараживания вещей, одежды и других объектов как наиболее адекватную модель возбудителя туберкулеза к температурному воздействию.

Тест-микроорганизм *Mycobacterium* B_5 хранится в музее Федерального государственного учреждения науки «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора (117246, Москва, Научный проезд, д. 18).

Mycobacterium terrae (ATCC 15755, DSM 43227) представляют собой короткие прямые палочки малиново-красного цвета, располагающиеся в мазке параллельно друг другу, наподобие частокола. Микобактерии *M. terrae* неподвижные, грамположительные, не образующие спор и капсул. В связи с высоким содержанием миколовых кислот плохо окрашиваются обычными методами, но хорошо окрашиваются по Циль-Нильсену в малиново-красный цвет.

Микобактерии *M. terrae* – аэробы, температурные границы роста – от 25 до 37 °С, оптимальная температура – 37 °С.

M. terrae требовательны к питательным средам, растут на элективных средах (реакция среды почти нейтральная (pH 6,4—7,0): Левенштейна-Йенсена, «Новая», Миддлбрука 7H9 с 10 % ростовой добавки ADC, 7H10 с 10 % ростовой добавки OADC и др. Колонии *M. terrae* на среде Левенштейна-Йенсена – шероховатые и матовые выпуклые округлые образования, на среде «Новая» – гладкие и блестящие или с молочным или желтоватым оттенком. Длительность роста *M. terrae* на питательных средах зависит от состава среды. При оптимальной температуре инкубирования на «богатых» питательных средах Левенштейна-Йенсена и «Новая» рост *M. terrae* может появиться на 5—7 сутки. На «голодных» питательных средах инкубация *M. terrae* составляет до 8 недель.

M. terrae гидролизуют Твин-80 (т. к. продуцируют липазы), имеют высокоактивную каталазу и проявляют β-галактазную активность. Восстанавливают теллурит калия до металлического теллура в течение 9 дней.

По классификации патогенных для человека микроорганизмов относится к IV группе опасности, является непатогенным микроорганизмом.

Mycobacterium terrae используют для изучения и оценки туберкулоцидной активности ДС и их субстанций.

Тест-микроорганизм *M. terrae* хранится в Американской коллекции типичных культур (American Type Culture Collections); Немецком музее микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ – Deutcshe Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) и в других организациях.

Приложение 2

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

Методика приготовления среды Миддлбрука 7H9 (бульон) с 10 % ростовой добавки ADC (MADC-бульон для хранения замороженных культур при –70 °С):

- миддлбрук 7H9 порошок бульона – 4,7 г;
- глицерин ($C_3H_8O_3$) – 100,0 мл;
- вода (стерильная, дистиллированная) – 750,0 мл.

Ингредиенты соединить, перемешать, стерилизовать в паровом стерилизаторе при 1,1 атм. (121 °С) в течение 10 мин, охладить до 45 °С. Добавить в асептических условиях 100 мл ростовой добавки ADC и стерильной дистиллированной воды до 1 000,0 мл.

pH среды будет эквивалентен 6,6 ± 0,2 в бульоне, остывшем до 25 °С.

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 фосфорно-кислый – 2,4 г;
- магний лимонно-кислый – 0,6 г;
- магний серно-кислый – 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 подогреве (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 °С) в течение 20—30 мин. 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 ч для большего растворения. Затем фильтруют раствор через бумажный фильтр, разливают по флаконам или небольшим колбам и стерилизуют в паровом стерилизаторе при 1 атм. (121 °С) в течение 30 мин. 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 мин в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70 %-й этиловый спирт на 30 мин. 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 – 1 000 мл.

Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через 4-слойный стерильный марлевый фильтр. Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и *в течение не более 15 мин* 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 поме-

щают 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 °С в течение 45 мин.

Хранение среды.

Готовую питательную среду проверяют на стерильность, помещая 10 пробирок из вновь приготовленной партии в термостат при 37 °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 °С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели.

Методика приготовления среды «Новая».

Среда «Новая» – это плотная яичная среда, на которой хороший рост колоний *M. terrae* получают приблизительно на 5—7-й день после посева материала (проб).

В рецептуру питательной среды «Новая» входят следующие компоненты (в весовых %):

- калий фосфорно-кислый одноосновной – 0,05;
- натрий лимонно-кислый – 0,05;
- магний серно-кислый – 0,05;
- натрий пировиноградно-кислый (гликокол) – 0,2;
- глицерин – 3,6;
- малахитовая зелень – 0,036;
- желтки яиц – 50,0;
- дистиллированная вода – до 100,0.

Способ получения концентрированной питательной среды заключается в смешивании сухих навесок ингредиентов солей (кроме бактерицидного красителя) с желточной массой, обработке ингредиентов 70° этиловым спиртом, растворении бактерицидного красителя в глицерине и соединении всех компонентов среды.

Для получения 1 л концентрированной питательной среды необходимо:

- *сделать навески*: однозамещенного фосфорно-кислого калия – 1 г, лимонно-кислого натрия – 1 г, серно-кислого магния – 1 г, натрия

пировиноградно-кислого (гликокола) – 4 г, и каждую навеску поместить в стерильную фарфоровую ступку;

• *обеззаразить навески* путем смачивания каждой навески 1 мл 70° этилового спирта. Затем поместить ступки с навесками в термостат при температуре 37 °С и высушить при периодическом помешивании в течение 45 мин;

• *приготовить 1 л желточной массы.* 50 штук куриных яиц обработать снаружи с целью обеззараживания 70° спиртом. Затем отделить белок от желтка. Перенести желточную массу в мерную колбу и тщательно гомогенизировать;

• *приготовить желточно-солевую смесь.* К 1 л желточной массы (п. 3) добавить обеззараженные навески (п. 2) и перемешать;

• *приготовить раствор бактерицидного красителя.* Навеску 700 мг малахитовой зелени смочить 1 мл 70° спирта и соединить с 70 мл глицерина (это соответствует 1 %-му раствору малахитового зеленого в глицерине).

Получение концентрированной питательной смеси.

Производят соединение 1 л желточно-солевой смеси с 70 мл 1 %-го раствора малахитового зеленого в глицерине (п. 5) и тщательно гомогенизируют. Полученную концентрированную питательную смесь (среду) выдерживают в течение суток при комнатной температуре и разливают среду во флаконы емкостью 250 мл, которые герметично упаковывают и маркируют. Укупоренные флаконы с концентрированной питательной средой хранят в холодильнике при 3—5 °С в течение 3—4 недель.

Приготовление рабочей (используемой при тестировании дезсредств) плотной питательной среды в пробирках.

К концентрированной питательной среде добавляют равный объем стерильной дистиллированной воды (1 : 1), гомогенизируют, разливают по 5 мл в пробирки. Для образования скоса питательной среды пробирки укладывают в наклонном положении в свертыватель, предварительно нагретый до 90 °С. Среду коагулируют 20 мин при температуре 82—83 °С. Контроль приготовленной партии среды на стерильность осуществляют так же, как описано для среды Левенштейна-Йенсена.

Хранение пробирок с питательной средой.

Пробирки с питательной средой могут храниться в холодильнике при температуре 5 °С в течение 4 недель. При длительном хранении необходимо пробирки герметично укупорить и поместить в полиэтиленовые пакеты, чтобы предотвратить высыхание среды.

Приложение 3

Материалы и оборудование, необходимые для проведения испытаний

Химические вещества

Магний серно-кислый $MgSO_4 \times 7H_2O$	ГОСТ 4523—77
Натрий лимонно-кислый $C_6H_5O_7Na_3 \times 5{,}5H_2O$	ГОСТ 22280—86
Калий фосфорно-кислый однозамещенный KH_2PO_4	ТУ-6-09-5324—87
Натрий пировиноградно-кислый	ТУ 6-09-08-990—83
Глицерин $C_3H_8O_3$	ГОСТ 6259—75
Малахитовый зеленый $C_{52}H_{54}O_{12}N_4$	ТУ-6-09-1557—77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—77
Желтки куриных яиц	
Магний лимонно-кислый $Mg_3(C_6H_5O_7)_2 \times 14H_2O$	ТУ-6-09-1770—77

L-аспарагин $C_4H_8N_2O_3 \times H_2O$ импортный реактив
Миддлбрук 7H9 порошок бульона – импортная среда
10 % ADC ростовая добавка – импортный реактив
Нейтрализующий бульон Ди-Ингли – фирма HIMEDIA

Спирт этиловый, ректификационный технический	ГОСТ 18300—72

Стерильная дистиллированная вода

Оборудование

Весы лабораторные (например, весы для химических реактивов с точностью до 0,01 г, ГОСТ 24104—80, рекомендованные к применению приказом МЗ РФ № 109).

Аппарат для свертывания питательных сред (например, АСПС – «Торгмаш», рег. № 29/07020401/3573—02).

Термостат на 37 °С (например, термостат суховоздушный ТВ-80-«ПК-К», рег. № 98/219–151).

Низкотемпературная морозильная камера для хранения тест-культур микроорганизмов (например, морозильник сверхнизких температур MDF – 4086S, рег. № 60202380).

Камера на 1 или 2 $м^3$ с необходимыми приспособлениями для изучения обеззараживания воздуха.

Микроскоп.

Аэрозольный генератор.

Гидропульт, автомакс, «Квазар».

Шейкер (например, шейкер лабораторный S-3.02, рег. № 14413, ГОСТ 12.2.05).

Бытовой холодильник (например, холодильник-морозильник STINOL 256Q, сер. № 103410881041).

Плита электрическая бытовая, ГОСТ 14919—83.

Штативы лабораторные химические, ТУ 48-0534-8—87.

Тест-объекты: ткань бязевая или батистовая; поверхности размером 10 × 10 см из различных материалов; предметы ухода за больными; игрушки мелкие и крупные из различных материалов; медицинские инструменты, разнообразные по форме, характеру поверхности и материалу; жесткий и гибкий эндоскопы; набор резиновых и пластиковых трубок; столовая посуда и приборы; лабораторная посуда и посуда из-под выделений; бинты, вата.

Секундомер механический, ГОСТ 8.423—81.

Термометры, ГОСТ 215—73.

Карандаш по стеклу, ТУ 46-22-904—78.

Лабораторная посуда

Пипетки, вместимостью 1,0 и 10,0 см^3, 2-го класса точности	ГОСТ 20292—74
Пробирки химические	ГОСТ 10515—6
Чашки Петри	ГОСТ 25336—82
Спиртовка лабораторная или газовая горелка	ГОСТ 25336—82
Цилиндры, вместимостью 100,0 и 250,0 см^3	ГОСТ 1770—74
Колбы, вместимостью 100,0, 250,0 и 1 000,0 см^3	ГОСТ 25 336—82
Склянки Дрекселя	

Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств

Методические указания
МУ 3.5.2596—10

Редакторы Л. С. Кучурова, Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 28.05.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,5

Тираж 500 экз. Заказ 34

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru