

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Инструкция 4.2.10-22-1-2006

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОМЕЩЕНИЙ В
ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СТЕРИЛЬНОСТИ
ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Минск – 2006

УТВЕРЖДЕНО

Постановление

Главного государственного

санитарного врача

Республики Беларусь

28 января 2006 г. №7

ИНСТРУКЦИЯ 4.2.10-22-1-2006

«МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОМЕЩЕНИЙ В
ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СТЕРИЛЬНОСТИ
ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ»
ГЛАВА 1

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция устанавливает методы микробиологического контроля объектов внешней среды в организациях здравоохранения (воздуха, предметов мебели, приборов, оборудования и др.), с целью оценки санитарно-гигиенического состояния помещений, а также методы контроля стерильности изделий медицинского назначения (медицинского инструментария, зондов, катетеров, бужей, резиновых перчаток, шовного материала и др.).

2. Настоящая Инструкция предназначена для специалистов организаций здравоохранения и других заинтересованных организаций. Инструкция является обязательной к применению в ходе проведения микробиологических исследований эпидемически значимых объектов внешней среды в организациях здравоохранения (объекты, подвергнутые дезинфекции и стерилизации находящиеся в подготовленных к работе с пациентами операционных, перевязочных, процедурных кабинетах и др.).

3. Перечень объектов, подлежащих микробиологическому контролю, периодичность и объем микробиологических исследований, определяются врачом-эпидемиологом. Микробиологические исследования объектов внешней среды в организациях здравоохранения проводятся в плановом порядке и по эпидемиологическим показаниям.

4. Микробиологическому обследованию подвергаются эпидемически значимые объекты внешней среды, которые могут послужить факторами передачи микроорганизмов на кожные покровы, слизистые оболочки, раневые поверхности, а также способствующие микробной контаминации крови, инъекционных растворов.

5. Микробиологическому исследованию подвергаются предметы нарушающие целостность кожных покровов и слизистых оболочек, контактирующие с растворами для инъекций, раневой поверхностью: изделия медицинского назначения для проведения медицинских манипуляций на стерильных областях пациентов, хирургические перчатки, шовно-перевязочный материал, препараты для ухода за слизистыми оболочками пациентов, лекарственные формы для инъекций, операционное белье в операционных и перевязочных, катетеры, зонды, интубационные трубки и др. объекты.

6. Отбор проб для микробиологических исследований должен проводиться в подготовленных к работе помещениях; во время оказания медицинской помощи пациентам отбор проб в этих помещениях не проводится.

ГЛАВА 2

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ

7. Микробиологическое исследование воздушной среды предусматривает:

определение общего микробного числа (КОЕ/м³);

определение содержания *Staphylococcus aureus* (КОЕ/м³);

определение содержания дрожжеподобных и плесневых грибов, микобактерий туберкулеза, патогенных грамотрицательных бактерий и др. (по усмотрению врача-эпидемиолога).

8. Пробы воздуха отбирают аспирационным методом. Скорость протягивания воздуха зависит от модели используемого воздухозаборника. Количество пропущенного воздуха должно составлять по 1000 литров для определения общего содержания бактерий и для определения наличия золотистого стафилококка.

9. Исследование воздуха седиментационным методом допускается только для боксов при микробиологических исследованиях изделий медицинского назначения на стерильность.

Метод заключается в седиментации микроорганизмов на плотные питательные среды в открытых чашках Петри. Чашки Петри с питательными средами устанавливают в зонах наиболее высокой вероятности контаминации воздуха. Критерии оценки микробной обсемененности воздуха приведены в приложении 1 к настоящей Инструкции.

ГЛАВА 3

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ

ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

10. Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды предусматривает выявление стафилококка, бактерий группы кишечной палочки (далее – БГКП), синегнойной палочки и других микроорганизмов. Забор проб с поверхностей различных объектов осуществляют методом смывов.

11. Взятие смывов производят стерильным ватным тампоном на палочках, смонтированных в пробирки или марлевыми салфетками, размером 5x5 см, простерилизованными в бумажных пакетах или в чашках Петри. Для увлажнения тампонов в пробирки с тампонами наливают по 5,0 мл стерильного раствора нейтрализатора. При применении дезинфектантов, содержащих хлор или перекись водорода, в качестве увлажняющей жидкости следует использовать раствор нейтрализатора (1% пептонная вода + 3% ТВИН-80 + 0,5% тиосульфата натрия), при применении других - 1% пептонная вода + 3% ТВИН-80 + 0,3% лецитина. При использовании салфеток стерильный раствор нейтрализатора разливают в стерильные флаконы по 5,0 мл. Салфетку захватывают стерильным пинцетом, увлажняют нейтрализатором и, после протирания исследуемого объекта, помещают во флакон.

При контроле мелких предметов смывы забирают с поверхности всего предмета; при контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят в нескольких местах исследуемого предмета площадью примерно в 100-200 см².

12. Для выделения стафилококков делают посев смывной жидкости непосредственно на чашку Петри с желточно-солевым агаром (далее – ЖСА) и тампона в среду накопления, используя в качестве сред накопления бульон с 6,5% хлористого натрия, бульон с 1% глюкозы, разлитые в пробирки по 5 мл. Засеянные пробирки инкубируют при (37 + 1)0С в течение 20-24 часов, после чего делают высев на ЖСА.

13. Исследование на стафилококк.

Посев на элективную среду (ЖСА, молочно - солевой или молочно - желточно - солевой агар). Засеянную среду выдерживают в термостате при (37 + 1)0С в течение 48 часов.

14. Учет результатов. Стафилококк растет в виде круглых, блестящих, маслянистых, выпуклых пигментированных колоний. На средах, содержащих желток, золотистый стафилококк в 60-70% случаев образует радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция). Для накопления культуры на скошенный агар отсевают не менее 2-х колоний, подозрительных на стафилококк, и, прежде всего, колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию. При отсутствии на чашках таких колоний дальнейшему исследованию подвергаются пигментированные колонии, схожие по морфологии со стафилококком. При одновременном наличии на чашках колоний стафилококка, отличающихся по пигменту, следует исследовать не менее двух колоний различного вида.

Пробирки с посевом помещают в термостат при (37 + 1)0С. После суточной инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности.

Окраску по Граму проводят общепринятым методом. При микроскопии окрашенные по Граму стафилококки имеют вид фиолетово - синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими скоплениями ("кружево").

Плазмокоагулирующую активность определяют в реакции коагуляции плазмы (далее - РКП).

С учетом результатов РКП и лецитовителлазной активности, может быть подтверждена принадлежность выделенного штамма к виду золотистого стафилококка и выдан соответствующий ответ.

Если культура обладает только плазмокоагулирующей или только лецитовителлазной активностью, то для окончательного ответа требуется определение ферментации маннита в анаэробных условиях.

Ответ выдают в зависимости от результатов, полученных при определении признаков согласно приложению 2 к настоящей Инструкции.

15. Тест ферментации маннита в анаэробных условиях. Суточную агаровую культуру засевают уколом в столбик полужидкой среды Гисса с маннитом, на поверхность среды наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при $(37 + 1)0C$, в течение 5 суток, ежедневно просматривают и ведут учет. Положительной считается реакция изменения цвета среды.

16. Реакция плазмокоагуляции ставится в соответствии с «Инструкцией по применению плазмы кроличьей цитратной сухой», выпускаемой предприятиями по производству бактериальных препаратов.

17. Определение БГКП. К БГКП относятся факультативно-анаэробные, грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, сбрасывающие лактозу (глюкозу) с образованием кислоты и газа при $(37 + 1)0C$ в течение 24-48 часов, в основном, являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* (т.е. учитываются цитратположительные и цитратотрицательные варианты БГКП).

Для выявления БГКП производят посев на среду обогащения, для чего тампон (марлевую салфетку) погружают в 10-20% желчный бульон или среду Кесслера. Через сутки инкубирования при $(37 + 1)0C$ делают пересев на среду Эндо.

При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП (красных и темно-красных с металлическим блеском или без него, розовых или бледно-розовых), выдают заключение об отсутствии БГКП. При наличии на среде Эндо характерных колоний из них готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют; выполняют пробу на оксидазу. Наличие в мазках грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек предполагает присутствие БГКП. Исследуемые колонии засевают на среду Гисса с лактозой или глюкозой. Инкубируют $(37 + 1)0C$ 24 часа. Первичный учет проводят через 4-6ч. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ. При выявлении на среде Эндо мелких бесцветных колоний, подозрительных на наличие возбудителей кишечных инфекций, колонии снимают и изучают на принадлежность к патогенным микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae*.

18. Определение синегнойной палочки. Синегнойная палочка грамотрицательная, облигатно-аэробная, не образующая спор палочка, оксидазоположительная, образующая сине-зеленый пигмент.

Для выявления синегнойной палочки из среды Кесслера делают пересев на мясопептонный агар (далее – МПА) с фурагином, термостатируют (37 + 1)0С в течение 48 часов. Колонии синегнойной палочки плоские, сине-зеленого цвета со специфическим ароматическим цветочным запахом. На среде Эндо колонии плоские, с неровными краями, от бледно-сиреневого, до темно-сиреневого цвета.

Дифференциальным признаком синегнойной палочки является ее способность окислять глюкозу в аэробных условиях и отсутствие таковой в анаэробных. Для этого исследуемую культуру засевают в 2 пробирки с 4 мл среды Хью-Лейфсона или полужидкой среды Гисса с глюкозой, в одну из которых вносится 0,5 мл вазелинового масла. Посевы инкубируют при (37 + 1)0С до 4-х суток, ежедневно учитывается результат посева. Изменение цвета среды в пробирке без вазелинового масла свидетельствует об окислении глюкозы.

ГЛАВА 4

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

19. Правила отбора проб для контроля стерильности.

Отбор проб на стерильность проводит уполномоченный представитель органа государственного санитарного надзора или обученный медицинский персонал организаций здравоохранения в стерильные емкости с соблюдением правил асептики непосредственно перед проведением манипуляций и операций.

Для контроля стерильности используют следующие питательные среды:

сахарный бульон Хоттингера (0,5 и 1% глюкозы);

тиогликолевую среду;

бульон Сабуро.

Обязателен посев изделий на 3 вышеуказанные среды. При посеве изделия или его части непосредственно в питательную среду количество среды в пробирке (колбе, флаконе и т.д.) должно быть достаточным для полного погружения изделия или его части.

Посевы в бульон Хоттингера и тиогликолевую среду выдерживают в термостате при температуре 30-350С, среду Сабуро - при температуре 20-250С.

Посевы инкубируют в термостате в течение 14 суток.

В организациях здравоохранения, имеющих централизованные стерилизационные отделения, контролю на стерильность подлежит не менее 1% от числа одновременно стерилизованных изделий одного вида.

Количество отбираемых проб для контроля стерильности изделий медицинского назначения, стерилизованных радиационным и газовым методом в промышленных условиях определяется по формуле:

$0,4\sqrt{n}$, где n - количество изделий в одной партии, при минимальном количестве проб – 3 и максимальном – 40.

При неудовлетворительном результате исследования, отбирается удвоенное количество образцов для вторичного посева.

20. Требования, обеспечивающие асептические условия при посевах на стерильность:

20.1. требования к помещению:

посев исследуемого материала рекомендуется проводить в боксах с ламинарным потоком воздуха. Эти боксы размещают в отдельных помещениях бактериологической лаборатории. При отсутствии боксов с ламинарным потоком воздуха контроль стерильности проводят в боксированных помещениях (бокс с предбоксником). Требования предъявляемые к устройству боксированных помещений изложены в Санитарных правилах 17-129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 27 июля 2000 года, № 40;

20.2. подготовка помещений бокса, инструментов и персонала к работе:

ежедневно до проведения работы помещения бокса и предбоксника подвергают тщательной обработке. Стены, пол, поверхности рабочих мест, инвентаря протирают дезинфицирующим средством, зарегистрированным в Республике Беларусь. Внутреннюю поверхность бокса с ламинарным потоком воздуха обрабатывают так же, как и помещение бокса. Через 45-60 минут после обработки, в бокс вносят все необходимые для работы материалы и инструменты, кроме исследуемых образцов;

перед внесением материалов в ламинарном боксе включают вентиляцию на время, достаточное для обеспечения полного обмена воздуха в нем;

за 1,5-2,0 часа до начала работы в боксе и предбокснике на 1,0-1,5 часа включают бактерицидные лампы. Работа в боксе осуществляется не ранее, чем через 15 минут после отключения бактерицидной лампы;

инструменты, посуда и спецодежда, используемые в работе, должны быть стерильными;

перед входом в бокс работники лаборатории тщательно моют руки теплой водой с мылом, обрабатывают кожным антисептиками по режиму хирургической антисептики, одевают в предбоксы на ноги бахилы, стерильные халаты, маски, шапочки, стерильные перчатки. Используемые антисептики должны быть из числа зарегистрированных в Республике Беларусь.

в процессе посева в боксе регулярно проверяют обсемененность воздуха. Для этого на рабочий стол ставят 2 чашки с МПА, открывая их на 15 минут, затем чашки помещают в термостат при температуре $(37+1)0C$ на 48 часов.

Допускается рост не более трех колоний неспорообразующих сапрофитов;

в случае роста на чашках более 3 колоний проведение дальнейших работ в данном боксе запрещается, в нем дополнительно проводят тщательную обработку дезинфицирующим средством;

20.3. контроль стерильности изделий медицинского назначения проводят путем их погружения в питательные среды. В исключительных случаях, когда необходимо проверить стерильность инструмента больших размеров, пробы готовят методом смыва, стерильной марлевой салфеткой размером 5×5 см², предварительно увлажненной стерильным физиологическим раствором или стерильной дистиллированной водой.

Перед посевом исследуемые образцы вносят в предбоксы, предварительно снимая наружную мягкую упаковку. В предбоксе пакеты, биксы протирают снаружи с помощью стерильного пинцета (корнцанга) стерильной салфеткой (ватным тампоном), смоченной дезинфицирующим средством, перекладывают на стерильный лоток и оставляют на 30 минут. При поступлении изделий в мягкой упаковке, первый слой упаковки снимают в предбоксе, изделия во внутренней упаковке сразу переносят в бокс. Посевы на стерильность проводит бактериолог с помощью лаборанта.

21. Посевы на стерильность:

21.1. хирургический инструментарий с помощью стерильного пинцета извлекают из бикса или мягкой упаковки и целиком погружают в пробирки с питательными средами. В случаях, если стерилизованные инструменты находящиеся в одной упаковке крупных размеров (иглодержатели, ранорасширители и т.д.), производят смыв с поверхности инструмента стерильной салфеткой, смоченной в стерильном физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде и погружают салфетку в пробирку с тиогликолевой средой. Аналогичные смывы с других инструментов засевают в пробирки со средой Хоттингера и Сабуро;

21.2. методика посева на стерильность игл и шприцев -

для контроля на стерильность отбирают шприцы малой емкости (1,0 или 2,0 мл) в условиях бактериологического бокса, с соблюдением правил асептики

погружают в пробирки с питательными средами (отдельно цилиндр, поршень, иглы);

при необходимости контроля стерильности шприцев большой емкости (10, 20 мл и более) исследование производят методом смыва, при этом стерильной салфеткой, смоченной в стерильных физиологическом растворе или водопроводной воде, протирают с помощью пинцета внутренние части шприца и погружают салфетку в питательную среду;

21.3. исследование на стерильность систем переливания крови -

от силиконовой трубки, ближе к игле, отрезают ножницами с помощью пинцета небольшие кусочки (1-2 см) и погружают в пробирки с питательными средами, иглу отдельно погружают в питательные среды;

21.4. посев на стерильность катетеров, резиновых перчаток и др. изделий из резины и пластикатов -

контроль стерильности зондов, катетеров, резиновых перчаток и других изделий из резины производят путем полного погружения мелких изделий в питательные среды, от более крупных, с помощью стерильного пинцета, стерильными ножницами отрезают небольшие кусочки (1-2 см) и погружают в питательные среды;

21.5. посев на стерильность хирургического шовного материала -

перед посевом, емкость с отобранными образцами шовного материала, в предбокснике протирают стерильной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим средством, зарегистрированным в Республике Беларусь, затем ее вносят в бокс;

21.6. кетгут перед посевом подвергают специальной обработке для нейтрализации и отмывания нейтрализующего раствора. Моток кетгута, приготовленный для исследования, перекалывают стерильным корнцангом или пинцетом в стерильный 10% раствор гипосульфита натрия. Раствор гипосульфита натрия готовят на дистиллированной воде, разливают в пробирки (колбы) по 20-30 мл, стерилизуют при 1200С 30 минут. Кетгут выдерживают в растворе гипосульфита в течение 24 часов при комнатной температуре (возможно помутнение раствора за счет выпадения серы), затем перекалывают в пробирки с 20-30 мл стерильной дистиллированной воды, где также выдерживают в течение 24 часов при комнатной температуре. Непосредственно перед посевом моток кетгута извлекают стерильным пинцетом и перекалывают в стерильную чашку Петри, с помощью пинцета и ножниц его разрезают на мелкие кусочки длиной 1-2 см и разъединяют для прорастания микроорганизмов внутри кетгута;

посев производят в 2 пробирки с тиогликолевой средой, 2 пробирки со средой Сабуро и 2 пробирки со средой Хоттингера, помещая в каждую пробирку по 4-5 отрезков исследуемого материала;

21.7. шелк (лавсан) перед посевом помещают на 24 часа в стерильную дистиллированную воду при комнатной температуре. Перед посевом моток шелка (лавсана) перекладывают в стерильные чашки Петри, разрезают на отрезки, длиной 1-2 см. Посев шелка производят так же, как и кетгута;

21.8. исследование на стерильность аппаратов экстракорпорального кровообращения проводят после асептической сборки аппарата;

контролю подлежат: смыв из аппарата, перфузат до перфузии, кровь после перфузии;

стерильный физиологический раствор в количестве не менее 250 мл прогоняют через аппарат, подготовленный к операции, отбирают 100 мл раствора и засевают на питательные среды. Аналогично производят посев перфузата до перфузии и крови после перфузии;

21.9. посев на стерильность перевязочного материала. Бинты, ватные шарики, марлевые салфетки, турунды и т.п. отбирают из разных мест бикса стерильным пинцетом. Мелкие изделия целиком погружают в пробирки с питательными средами. От бинтов (внутренних частей) и крупных марлевых салфеток, с помощью стерильных ножниц, отрезают кусочки и погружают в пробирки с питательными средами. На каждый вид перевязочного материала используют по 2 пробирки каждой среды;

21.10. посев на стерильность хирургического белья -

стерилизованными и фламбированными ножницами, с помощью пинцета, от хирургического белья отрезают небольшие кусочки ткани (завязка, внутренние швы и т.п.) и погружают в пробирки (колбы) с питательными средами, не касаясь краев пробирки (колбы);

21.11. учет результатов: материал стерилен при отсутствии роста во всех посевах, материал не стерилен при выявлении роста микрофлоры;

21.12. посевы на стерильность других изделий медицинского назначения выполняются в зависимости от размера и назначения изделия по методикам, аналогичным описанным выше.

ГЛАВА 5

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, РЕАКТИВЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

22. Аппаратура и инструментарий:

Нормативная

документация (ГОСТ, ТУ)

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений рН + 0,01	ГОСТ 19881-74 ТУ 64-1-28-70-76 ТУ 64-1-1382-72
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющих поддерживать температуру (180+5)0С	ТУ 64-1-1382-72 ГОСТ 24104-2001
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 370С с отклонением от заданной + 10С	ГОСТ 19569-89Е ТУ 16-535-84
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 240С с отклонением от заданной + 10С	ГОСТ 21241-89Е ГОСТ 21239-93
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 21240-89
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 3145-84Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с	
Облучатель бактерицидный настенный	
ОБН-150 или других видов	
Холодильник бытовой	
Пинцет медицинский	
Ножницы медицинские	
Скальпель хирургический, 15 см	
Штативы для пробирок	

Часы механические сигнальные

Прибор аспирационный для отбора проб воздуха модель 818 (аппарат Кротова) или любые другие пробоотборники, разрешенные для применения

Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, обеспечивающими требуемую точность и погрешность измерений.

23. Лабораторная посуда и материалы:

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770-74 ГОСТ 25336-82E
Воронки стеклянные	ГОСТ 5556-81
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 29227-91
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 25336-82E
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 6672-75E
Стеклянные предметные для микропрепаратов	ГОСТ 23932-90E
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90E
Чашки биологические (Петри)	

24. Реактивы, компоненты сред:

Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038-79 ГОСТ 18300-87
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 5962-67
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 423377
Желток куриного яйца	
Маннит	ГОСТ 13805-76 ГОСТ 4159-79
Набор реактивов для окраски по Граму	ГОСТ 4232-74
Натрий хлористый (ч., х.ч., ч.д.а.)	ГОСТ 2493-75
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 6824-76 ГОСТ 4328-77
Фурагин (медпрепарат)	ГОСТ 3164-78
Йод кристаллический	ГОСТ 27068-86
Калий йодистый	
Фуксин основной	
Фенол	
Калий фосфорнокислый двузамещенный (K ₂ HPO ₄)	
Кристаллический фиолетовый	
Гидролизат казеина	
Дрожжевой экстракт	
Цистин	

Тиогликолевая кислота

Резазурин

Бромтимоловый синий

Глицерин

Натрия гидроокись

Масло вазелиновое медицинское

ТВИН-80

Лецитин

Натрий серноватистокислый (тиосульфат натрия)

25. Готовые питательные среды:

Питательная среда для контроля стерильности сухая (тиогликолевая среда)	ФС 42-3390-97 (ГНЦ ПМ)
Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)	ФС 42-3377-97 (ГНЦ ПМ)
Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон)	ФС 42-3378-97
Питательная среда для выделения стафилококков сухая (стафилококкагар)	(ГНЦ ПМ) ФС (ГНЦ ПМ)
Питательная среда № 2 ГРМ для контроля микробной загрязненности сухая (для выращивания грибов Сабуро)	ВФС 42-3068-98 (ГНЦ ПМ) ВФС 42-3110-98

Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо – ГРМ)	(ГНЦ ПМ)
Питательная среда для обнаружения бактерий группы кишечной палочки (среда Кесслера – ГРМ)	ФСП 42- 0084019200 (ГНЦ ПМ)
Среды Гисса с маннитом и др.	
Основа агара с цетримидом без глицерина (Cetrimide Agar Base w/o Glycerine)	ФС (ЦНИИВС им. И.И. Мечникова, НИИ питательных сред) Hi Media

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения, зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 6

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

26.Способ приготовления питательных сред:

Тиогликолевая среда

Состав:

гидролизат казеина (в пересчете на сухой остаток - 15 г;

дрожжевой экстракт (10% в пересчете на сухой остаток) - 5 г;

натрий хлорид - 2,5 г;

глюкоза - 5 г;

цистин - 0,75 г;

тиогликолевая кислота - 0,3 мл;

раствор резазурина 1:1000 свежеприготовленный - 1 мл;

агар-агар - 0,75 г;

вода дистиллированная до - 1000 мл;

pH среды после стерилизации 7,0-7,2.

Приготовление:

Смешивают все компоненты среды, кроме глюкозы и тиогликолевой кислоты.

Цистин предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при постепенном добавлении 10-20% раствора NaOH до его полного растворения. Смесь подщелачивают 10% раствором NaOH до pH 8,0-8,2, кипятят, постоянно помешивая до расплавления агара (5-10 минут). Можно автоклавировать 20 минут при 1000С, затем прибавляют горячую воду до первоначального объема, прибавляют глюкозу и тиогликолевую кислоту, фильтруют, устанавливают pH 7,2-7,3. Добавляют раствор резазурина, смешивают и разливают в стерильные пробирки по 20 мл. Стерилизуют 20 минут при 1200С.

Допускается приготовление среды без раствора резазурина натрия.

Допускается применение других сортов агара, но с заранее вытитрованным количеством.

Тиогликолевую среду хранят до посева, предохраняя ее от света, при комнатной температуре не более 7 суток со дня приготовления.

Питательный агар с 0,5% глюкозы

Состав:

панкреатического гидролизата казеина (в пересчете на сухой остаток) - 15 г;

дрожжевого экстракта (10%) (в пересчете на сухой остаток) - 5 г;

глюкозы - 5 г;

натрия хлористого (с учетом содержания в гидролизате) - 5 г;

агара (в зависимости от плотности агара) - 10-20 г;

воды дистиллированной - до 1000 мл;

pH среды после стерилизации 7,2-7,4.

Приготовление:

Смешивают все компоненты среды, кроме глюкозы, подщелачивают 10-20% раствором NaOH до pH 8,0-8,2 и оставляют на 20-30 минут для набухания агара. Затем его расплавляют в автоклаве текучим паром или в открытом котле с подогреванием в течение 30 минут, отстаивают 20-30 минут, отфильтровывают через ватный фильтр. В полученный после фильтрации объем среды добавляют глюкозу, устанавливают pH 7,3-7,5, разливают в стерильные пробирки по 5 мл. Стерилизуют при 110-112°C (0,5 атм) в течение 30 минут.

Агар годен для применения в течение 3 месяцев при хранении в холодильнике (4-10°C) или 1 месяц при комнатной температуре.

Бульон Хоттингера с 0,5% (1,0%) глюкозы

Состав:

мясной перевар по Хоттингеру до разведения аминного азота на 140-160 мг%;

натрий хлористый - 0,5%;

глюкоза - 0,5% (1,0%);

вода дистиллированная - до 1000 мл;

pH среды после стерилизации 7,2-7,4.

Приготовление.

Смешивают мясной перевар по Хоттингеру с водой в таком соотношении, чтобы в среде содержалось 140-160 мг% аминного азота, добавляют хлористый натрий. Смесь подщелачивают 10% NaOH до pH 8,0-8,2, кипятят на открытом огне 10 минут или автоклавируют при 100°C 10 минут. Если есть выкипание, доводят объем до первоначального кипяченой или дистиллированной водой. Фильтруют через ватный тампон, прибавляют 0,5% (1,0%) глюкозы, устанавливают pH 7,3-7,5 добавлением 5% HCl. Фильтруют и разливают в стерильную посуду.

Стерилизуют при 110°C в течение 30 минут.

Среда Сабуро

Состав:

сухой пептон ферментативный - 10 г;

глюкоза или мальтоза - 100 г;

вода дистиллированная до 1000 г;

pH среды после стерилизации 5,5-5,8.

Приготовление.

В воду добавляют пептон, кипятят 10 минут и фильтруют. К полученному объему после фильтрации добавляют глюкозу или мальтозу. Если pH выше, чем 5,7, нужно подкислить 5% раствором HCl до pH 5,7.

Разливают в стерильные пробирки по 10 мл.

Стерилизуют при 1100С (0,5 кгс/кв. см - 30 минут).

Изотонический (0,85% -ный водный раствор хлорида натрия).

0,85г хлористого натрия растворяют в 100см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре 121 + 10С. Хранят при комнатной температуре не более 14 суток.

Желточно-солевой агар (ЖСА).

В качестве основы используют элективный солевой агар для стафилококков. По прописи, указанной на этикетке, готовят агар. К расплавленному и охлажденному до 45-500С агару добавляют 20% желточной взвеси (асептически извлеченный из яйца желток взбалтывают с 200мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают агар с желточной взвесью, разливают по 20мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике в течение 2-х недель.

Молочно-солевой агар.

К расплавленному и охлажденному до 45-500С агару добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, смешивают и разливают среду в чашки Петри. Хранят в холодильнике не более 2-3х дней.

МПА с фурагином.

К расплавленному и охлажденному до 45-500С МПА добавляют фурагин из расчета 0,002грамма на 100мл. Стерилизуют при 1120С 30мин.

Желчный бульон.

Состав: бульон мясопептонный или Хоттингера 800мл, желчь бычья нативная 200мл.

Приготовление: рН должен быть равен 7,6. Разливают в стерильные пробирки, стерилизуют текучим паром 2 дня по 30мин.

Кровяной агар.

К расплавленному и охлажденному до 45-50С МПА добавляют 5% дефибринированной крови животных. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Среда Хью –Лейфсона.

Пептон - 2г;

Натрий хлорид -5г;

Калий гидрофосфат (K_2HPO_4) – 3г;

Агар – 3г;

Бромтимоловый синий (1% водный р-р) – 3мл;

Глюкоза – 10г;

Вода дистиллированная – 1000мл;

Приготовление: все ингредиенты растворяют при подогревании в водяной бане, фильтруют, разливают в пробирки по 5-6мл, стерилизуют при 1100С 10мин. Готовая среда должна иметь рН 7,1-7,2.

27. Растворы и реактивы для окраски препаратов по Граму.

Реактив 1 (для первичной окраски).

Состав: генцианвиолет или кристалвиолет 1г, спирт этиловый 960С 10мл, фенол 2г растирают в ступке, добавляя 100мл дистиллированной воды.

Реактив 2. Раствор Люголя: 1г йода кристаллического, йодистого калия 2г растворить в 300мл дистиллированной воде, хранить во флаконе из темного стекла.

Реактив 3. Спирт этиловый 960С.

Реактив 4. Фуксин феноловый, разведенный: а) Фуксин основной 10г, спирт этиловый 960С 100мл, ингредиенты смешивают и ставят в термостат на 18-20 часов, б) Фенол 5г, вода дистиллированная 10мл. Смешивают 10мл раствора фуксина и 100мл фенолового раствора, для работы разводят дистиллированной водой 1:10.

28. Нейтрализатор:

На 100мл дистиллированной воды 1г пептона, 0,5г NaCl, 3% ТВИН-80, 0,3% лецитина, автоклавировать при 1атм 20минут.

На 100мл дистиллированной воды 1г пептона, 0,5г NaCl, 3% ТВИН-80, 0,5% тиосульфата натрия, автоклавировать при 1атм 20минут.

29. Среды промышленного изготовления готовятся согласно прописям на этикетке или в соответствии с рекомендациями фирмы.

30. Контроль стерильности питательных сред.

Для контроля стерильности питательные среды после приготовления и стерилизации помещают в термостат при температуре (37 + 1)0С на 48 часов.

Сахарный бульон Хоттингера и среду Сабуро контролируют полностью (всю приготовленную серию пробирок или колб).

Тиогликолевую среду выдерживать при температуре (37 + 1)0С до использования не допускается, поэтому от каждой серии отбирают 1% от общего числа пробирок или колб и выдерживают их в термостате при температуре 37 + 10С в течение 48ч. Для контроля стерильности эту часть сред не используют.

Приложение 1

к Инструкции 4.2. -2006

«Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния

помещений в организациях здравоохранения и стерильности изделий медицинского назначения»

Критерии оценки микробной обсемененности воздуха

Наименование	Условие	Общее	Количество St.
объекта	работы	количество бактерий КОЕ/м3	aureus КОЕ/м3
операционные, процедурные,	до начала работы	не более 500	отсутствие

перевязочные,
послеоперационные
и реанимационные
палаты

Приложение 2

к Инструкции 4.2. -2006

«Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния помещений в организациях здравоохранения и стерильности изделий медицинского назначения»

Тесты для идентификации *Staphylococcus aureus*

№ варианта	Плазмо-коагулаза	Ферментация маннита в анаэробных условиях	Принадлежность штамма к виду
1.	+	-	Да
2.	+	+	Да
3.	-	-	Нет
4.	-	+	Да

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция 4.2. -2006

«Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического
состояния помещений в организациях здравоохранения и стерильности
изделий медицинского назначения»

стр.

Глава 1 Общие положения	2
Глава 2 Методы микробиологического исследования воздушной среды.....	3 3 6 10
Глава 3 Исследование микробной обсемененности объектов внешней среды.....	13 18
Глава 4 Микробиологический контроль стерильности изделий медицинского назначения.....	
Глава 5 Используемые аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды.....	19
Глава 6 Подготовка к анализу.....	
Приложение 1 Критерии оценки микробной обсемененности воздуха	
Приложение 2 Тесты для идентификации <i>Staphylococcus aureus</i>	

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

Настоящая Инструкция разработана отделом гигиены, эпидемиологии и профилактики Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Кожемякин А.К.), ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Гринь В.В., Гулин В.В., Пашкович В.В., Фидаров Ф.М., Марейко А.М., Федоренчик Л.А.), ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (Коломиец Н.Д.), Белорусским государственным медицинским университетом (Гудкова Е.И.), отделением общей хирургии ЛПУ «3-я городская клиническая больница г. Минска» (Сивец Н.Ф.).

Настоящая Инструкция утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 2006г. №

Введена взамен приложения 2 к приказу Министерства здравоохранения СССР от 31 июля 1978 года № 720 «Об улучшении медицинской помощи больным с гнойными хирургическими заболеваниями и усилении мероприятий по борьбе с внутрибольничной инфекцией».