

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь
И.В. Гаевский
2014 г.
Регистрационный № 007-0514



**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ПОМЕЩЕНИЙ**
Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены».

Авторы: к.м.н., доцент И.П. Щербинская, к.б.н., доцент Н.В. Дудчик,
В.В. Кравцова, С.А. Науменко, В.В. Трейлиб

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
07.06.2014
Регистрационный № 007-0514

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ПОМЕЩЕНИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. И.П. Щербинская, канд. биол. наук, доц. Н.В. Дудчик,
В.В. Кравцова, С.А. Науменко, В.В. Трейлиб

Минск 2014

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает методы количественного определения микробиологического загрязнения воздуха и поверхностей жилых, административных и общественных зданий, а также разработку программы исследования микробиологического загрязнения внутренней среды помещений.

2. Инструкция предназначена для использования в органах и учреждениях Министерства здравоохранения Республики Беларусь, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

3. Санитарно-микробиологический контроль является значимым методом гигиенического обследования жилых, административных и общественных зданий.

4. Унифицированные методы исследования позволяют получить сравнимые и достоверные данные, характеризующие санитарное благополучие жилых, административных и общественных зданий.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции использованы следующие термины с соответствующими определениями.

Колониеобразующая единица (КОЕ) — число живых микроорганизмов, рассчитанное по сформированным единичным колониям на плотных питательных средах, содержащееся в определенных объемах исследуемых проб.

Пробоотборник воздуха (аспиратор) — прибор, используемый для отбора заданных объемов воздуха за определенный промежуток времени в целях количественного определения содержания микроорганизмов.

Импактор — устройство, предназначенное для отбора частиц из воздуха или другого газа за счет осаждения микроорганизмов на твердую поверхность.

Тампон — стерильное, нетоксичное и не подавляющее рост микроорганизмов устройство для отбора проб, состоящее из соответствующего материала требуемых размеров, размещенного на аппликаторе.

Жилое помещение — помещение, пригодное для проживания граждан.

Административные здания — сооружения, объединенные общей архитектурной задачей создания среды для работы управленческого аппарата государственных, хозяйственных, общественных организаций и учреждений.

Общественные здания — общее определение зданий и сооружений, предназначенных для размещения в них различного вида учреждений и предприятий, призванных обеспечить социальное, бытовое, культурное и коммунальное обслуживание населения.

Точка отбора пробы — отраженное в документах место в контролируемой зоне, где производится отбор пробы для дальнейших микробиологических исследований. Точка выбирается исходя из потенциального влияния на организм человека.

ГЛАВА 3

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ПОМЕЩЕНИЙ

1. Разработка программы исследования осуществляется по результатам предварительного натурного осмотра помещений и анкетирования пользователей.

2. При разработке программы исследования учитывают потенциальные источники микробиологического загрязнения воздуха помещений. Источниками могут являться: человек и продукты его жизнедеятельности, строительные-отделочные материалы, мебель, ковровые покрытия и другие предметы интерьера, а также внешние источники (объекты окружающей среды, промышленные предприятия и т. д.).

3. Идентификация возможного источника загрязнения воздуха осуществляется при посещении помещения с учетом присутствия ощутимых запахов на основе натурного осмотра помещения, предметов мебели, внутренней отделки, оценки способа вентиляции и возможных внешних источников загрязнения.

4. Разработка программы исследования, идентификация возможного источника загрязнения воздуха в помещении, оценка результатов исследований проводится врачом-гигиенистом.

5. Может быть предусмотрен отбор более чем одной пробы в одной точке.

ГЛАВА 4

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

1. Требования безопасности

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003);
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004);
- техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории;
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при измерениях.

2. Требования к квалификации оператора

К измерениям могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, освоившие все операции, предусмотренные методикой.

ГЛАВА 5

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

1. При выполнении испытаний в лаборатории согласно СТБ ISO 7218 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при выполнении измерений (18–27)°С;
- атмосферное давление от 84 до 107 кПа (630–800) мм рт. ст.;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С;

- напряжение питающей сети (230±10)В;

- частота переменного тока (50±0,4)Гц.

2. Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

ГЛАВА 6

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

Оборудование

Анализатор потенциометрический	с	НД (ГОСТ, ТУ) ГОСТ 19881-74
погрешностью измерений рН ±0,1 (рН-метр)		
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (45±0,5) °С		ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г		ГОСТ 24104-88Е
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	с	ГОСТ 24104-88Е
Дистиллятор электрический		
Лупа с пятикратным увеличением		ГОСТ 25706-83
Прибор для счета колоний бактерий ПСБ		ТУ 64-1-2041-72
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	или	ГОСТ 19569-89
Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220)°С		ГОСТ 24437-89
Термометр (0–100)°С, цена деления 1°С		ГОСТ 24498-90
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50С°, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1°С	с	ТУ 64-1-1382-72
Холодильник бытовой		ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая		ГОСТ 14919-83
Аспиратор (импактор)		
Набор для взятия смыва (тампон)		

Материалы

Вата медицинская гигроскопичная		ГОСТ 5556-81
Марля медицинская		ГОСТ 9412-93
Колбы плоскодонные конические или круглые различной вместимости		ГОСТ 25336-82
Ножницы		ГОСТ 21241-89
Пробирки бактериологические типов П1 и П2		ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные		ГОСТ 23932- 90 Е
Штативы для пробирок		
Чашки Петри		ГОСТ 25336-82
Питательные среды и реактивы		
Мясопептонный агар		ГОСТ 10444.1-84

Среда Сабуро с левомецетином
Среда Чапека

ГОСТ 10444.1-84
ТУ 9229-014-00419789-
95)
ГОСТ 6709-72

Вода дистиллированная

Допускается применение оборудования и материалов с техническими и метрологическими характеристиками, не уступающими рекомендуемым, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

Используемая аппаратура должна иметь метрологическое обеспечение и государственную регистрацию на территории Республики Беларусь.

ГЛАВА 7 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.».

2. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроксида натрия массовой концентрацией 0,1 моль/дм³ или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм³. рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

3. Приготовление растворов реактивов

Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор):

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1)°С в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

ГЛАВА 8 ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНТАМИНАЦИИ ВОЗДУХА

1. Сущность метода

Метод основан на аспирации из воздуха жилых, административных и общественных зданий клеток и спор микроорганизмов на поверхность питательных сред и подсчете колоний, сформированных на поверхности этих сред.

Изучение микробиологической контаминации воздуха жилой среды проводят

по следующим показателям:

- общее число микроорганизмов в 1 м³ воздуха, КОЕ/1 м³;
- количество плесневых грибов в 1 м³ воздуха, КОЕ/1 м³.

2. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка пробоотборника (аспиратора), приготовление питательной среды, приготовление контактных чашек с питательной средой.

2.1. Подготовка аспиратора

Перед каждым отбором воздуха тщательно проводят дезинфекцию внутренней поверхности аспирационной насадки прибора. Применяемое дезсредство должно быть предназначено для дезинфекции металлических поверхностей.

2.2. Приготовление питательных сред

Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ГОСТ Р 51446-2001 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

Питательные среды готовят по общепринятым методикам микробиологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя.

2.3. Подготовка контактных чашек с питательной средой

Питательную среду расплавляют, остужают до 45-50°С, тщательно перемешивают. В асептических условиях вблизи пламени спиртовки разливают по 15–20 см³ в контактные стерильные чашки Петри и оставляют чашки на горизонтальной поверхности лабораторного стола до застывания питательной среды.

Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре (37 ± 2)°С после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха. Подготовленные контактные чашки с соответствующими средами могут храниться в холодильнике в течение 1 недели.

Для проведения используют соответствующие питательные среды (табл. 1):

Таблица 1 — Условия анализа показателей

Показатель	Питательная среда	Температура и время инкубации
Общее число микроорганизмов в 1 м ³ воздуха	Мясопептонный агар	30°С, 48–72 ч
Количество плесневых грибов в 1 м ³ воздуха	Агар Сабуро с левомицетином Среда Чапека	24°С, 72–120 ч

3. Отбор проб воздуха и культивирование отобранных проб

Отбирают пробы воздуха, исходя из предполагаемого содержания в ней микроорганизмов. Обычно рекомендуется отбирать для оценки общего микробного числа 200–500 дм³ воздуха, для оценки количества плесневых грибов — 30–150 дм³ воздуха.

Открывают аспиратор, устанавливают подготовленную чашку Петри со средой в аспиратор, одновременно снимая с нее крышку. Аспиратор закрывают. Соприкосновение крышки аспиратора со средой недопустимо.

Проводят отбор проб воздуха согласно инструкции к применяемому

аспиратору.

После отбора пробы воздуха аспиратор открывают, быстро снимают чашку Петри и закрывают крышкой от данной чашки. На дне чашки Петри маркером отмечают необходимые данные: точку контроля, дату отбора пробы и объем отобранной пробы. Каждая проба воздуха отбирается в двух повторностях.

Чашки Петри со средой после отбора проб воздуха могут храниться в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение не более 2 ч.

После отбора проб воздуха чашки Петри со средой помещают в термостат. Культивируют при режимах, указанных в табл. 1.

4. Обработка результатов измерений

4.1. Для оценки общего микробного числа после инкубирования подсчитывают все сформированные колонии.

Подсчет колоний осуществляется на двух параллельных чашках Петри, содержащих не более 250 колоний. При необходимости можно использовать лупу с 5-кратным увеличением.

При получении результата подсчета более 250 колоний хотя бы на одной чашке Петри повторяют измерения согласно п. 3, соответственно уменьшая объем отобранной пробы воздуха.

4.2. Для оценки общего количества плесневых грибов после инкубирования оценивают культурально-морфологические признаки сформированных колоний. При необходимости можно использовать лупу с 5-кратным увеличением.

Поскольку среда Сабуро является селективной для плесневых грибов и дрожжей, при учете результатов после термостатирования посевов колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально. Рост дрожжей на агаризованных средах сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем. Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Подсчитывают колонии плесневых грибов, имеющие типичные морфологические признаки.

Подсчет колоний осуществляется на двух параллельных чашках Петри, содержащих не более 20 колоний плесневых грибов. При получении результата подсчета более 20 колоний хотя бы на одной чашке Петри повторяют измерения согласно п. 3, соответственно уменьшая объем отобранной пробы воздуха.

4.3. Расчет концентрации микроорганизмов X , КОЕ/ м^3 , производят по формуле:

$$X = \frac{\bar{N} \times 1000}{V}, \quad (1)$$

где \bar{N} — количество колоний, выросших на чашке;
1000 — коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;
 V — объем отобранной пробы воздуха, дм^3 .

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение двух результатов параллельных измерений, рассчитанное по формуле (2):

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (2)$$

где X_1 — результат первого параллельного измерения;
 X_2 — результат второго параллельного измерения.

Результат измерений округляют до двух значащих цифр. Для этого, если третья цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если третья цифра больше или равна 5, предшествующую цифру увеличивают на единицу.

Результат измерения выражают числом между 1,0 и 9,9, умноженным на 10 в соответствующей степени.

ГЛАВА 9 ОЦЕНКА МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТЕЙ

1. Сущность метода

Метод основан на взятии проб с поверхностей различных объектов путем смыва, посева смывной жидкости непосредственно на чашки Петри с соответствующей средой и подсчете колоний, сформированных на чашке с питательной средой.

Оценка микробной контаминации поверхностей проводится по показателям общее микробное число и количество плесневых грибов.

2. Взятие смывов. Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов

В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливают (в условиях бокса над горелкой) по 5 мл стерильного 0,1% водного раствора пептона или изотонического раствора хлорида натрия таким образом, чтобы ватный тампон не касался жидкости.

Репрезентативной считается проба, снятая с поверхности 10×10 см (площадь 100 см²). Для ограничения поверхности может быть использован шаблон (трафарет) площадью 25 см², изготовленный из металла, который накладывают последовательно на 4 участка. Трафареты перед отбором смывов должны быть простерилизованы.

3. Методика определения общего микробного числа

Тампон тщательно отмывают, затем в зависимости от предполагаемой обсеменённости 0,1–1 мл смывной жидкости помещают в две параллельные чашки Петри, заливают расплавленным и остуженным до 45°C мясопептонным агаром (15–20 см³), размешивают круговыми движениями. После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 30°C на 72 ч.

После инкубирования подсчитывают все сформированные колонии на поверхности и в толще агара. Предварительный учет проводится через 48 ч, окончательный — через 72 ч.

При необходимости можно использовать лупу с 5-кратным увеличением.

4. Методика определения количества плесневых грибов

Тампон тщательно отмывают, затем в зависимости от предполагаемой обсеменённости 0,1–1 мл смывной жидкости помещают в чашку Петри и заливают расплавленным агаром Сабуро с левомицетином или агаром Чапека. Чашки помещают в термостат при 24°C.

После инкубирования оценивают морфологические признаки сформированных колоний и проводят подсчет колоний, имеющих типичные морфологические

признаки. При необходимости можно использовать лупу с 5-кратным увеличением.

Поскольку среда Сабуро является селективной для плесневых грибов и дрожжей, при учете результатов после термостатирования посевов колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально согласно п. 4.2 гл. 8 инструкции.

Предварительный подсчет выросших колоний производят через 72 ч, окончательный — через 120 ч.

5. Обработка результатов измерений

Рассчитывают плотность обсеменения на 100 см² по формуле (3):

$$X = \frac{\bar{N} \times V_2}{V_1}, \quad (3)$$

где \bar{N} — количество колоний на чашке;

V_1 — объем посеянной пробы (0,1–1,0 мл);

V_2 — объем пробы раствора для помещения смыва (5 мл).

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение двух результатов параллельных измерений, рассчитанное по формуле (4):

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

где X_1 — результат первого параллельного измерения;

X_2 — результат второго параллельного измерения.

Результат измерений округляют до двух значащих цифр. Для этого, если третья цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если третья цифра больше или равна 5, предшествующую цифру увеличивают на единицу.

Результат измерения выражают числом между 1,0 и 9,9, умноженным на 10 в соответствующей степени.

ГЛАВА 10 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

1. Результаты измерений оформляют по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

2. Результаты должны включать следующую информацию:

- наименование (шифр) пробы;
- дату проведения измерений;
- условия выполнения испытаний;
- результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- результаты параллельных измерений;
- окончательный результат измерений;
- фамилию лаборанта и врача-гигиениста.