

# **МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра,

Главный государственный санитарный врач

\_\_\_\_\_ М. И. Римжа

5 января 2007 г.

Регистрационный №120-1106

## **МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ ВНУТРИШКОЛЬНОЙ СРЕДЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканский научно-практический  
центр гигиены

АВТОРЫ: канд. биол. наук Н.В. Дудчик, канд. биол. наук Л.А. Мельникова,  
канд. мед. наук Т.Е. Науменко, канд. мед. наук Н.Ф. Фарино, С.А. Янецкая,  
Т.О. Козлова, Н.А. Грекова

Минск 2007

Инструкция устанавливает методы определения микробиологических показателей объектов школьной среды (воздуха, воды, продуктов питания и др.) и предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, а также других заинтересованных ведомств.

Санитарно-микробиологический контроль является значимым методом гигиенического обследования школьных учреждений и дает возможность объективно оценить уровень их санитарного состояния. Применение унифицированных методов исследования позволяет получить сравнимые и достоверные данные, характеризующие санитарное благополучие как отдельных объектов внутришкольной среды (столовая, спортивный зал, классные комнаты и др.), так и всего учреждения в целом, а также обобщать полученные данные. По результатам санитарно-микробиологических исследований можно судить о соблюдении санитарного режима в учебном учреждении, о соблюдении и возможных нарушениях правил личной гигиены персоналом и учащимися.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА АСПИРАЦИОННЫМ МЕТОДОМ**

Воздух закрытых помещений содержит большое количество микробов-сапрофитов, попадающих из разных источников (почвы, водных объектов, бытовых предметов, промышленных объектов и др.). Наряду с сапрофитной микрофлорой обнаруживаются санитарно-показательные, условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Некоторые представители патогенной микрофлоры могут вызывать патологические процессы на слизистых оболочках полости рта и верхних дыхательных путей. Патогенные микроорганизмы выделяются больным человеком или бактерионосителем с мельчайшими частицами слюны и слизи во время кашля, чихания, смеха и разговора.

Изучение микробиологической контаминации воздуха школьной среды целесообразно проводить по следующим показателям:

- общее число микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха, КОЕ/ $1 \text{ м}^3$ ;
- количество плесневых грибов, КОЕ/ $1 \text{ м}^3$ ;
- количество гемолитических стрептококков и стафилококков, КОЕ/ $1 \text{ м}^3$ .

Эти параметры свидетельствуют о степени загрязнения воздушной среды и могут служить показателями эпидемического неблагополучия.

Микробиологический анализ воздуха на патогенную микрофлору производят только по эпидемическим показаниям.

Принцип работы приборов-аспираторов заключается в том, что воздух всасывается с фиксированной скоростью за различные промежутки времени через насадку с серией маленьких отверстий, специально разработанную для этих целей. Отверстия в насадке позволяют направить ламинарный поток воздуха на поверхность агаризованной питательной среды в контактной чашке, соответствующей типу проводимого микробиологического

исследования. После завершения отбора проб воздуха чашка извлекается и инкубируется. Выросшие на чашке колонии микроорганизмов подсчитываются и служат основой для расчета индекса загрязнения воздуха.

**Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

Аспиратор (воздухоотборник).

Термостат.

Автоклав.

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками 2-го класса точности.

Шкаф сухожаровой.

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 20–100 °С с отклонением до 1 °С от заданной.

pH-метр.

Контактные чашки Петри.

Мясопептонный (или рыбный) агар.

Среда Сабуро.

Кровяной (или шоколадный) агар.

PCA 60 (Plate Count Agar).

SDA TW60 (Sabouraud Dextrose Agar).

**Подготовка питательных сред для исследования**

Для проведения анализа используют соответствующие питательные среды:

Таблица 1

Питание среды

Показатель	Питательная среда	Температура и время инкубации
Общее число микроорганизмов в 1 м <sup>3</sup> воздуха	Мясопептонный агар Рыбный агар PCA 60	30 °С, 24–48 ч
Количество гемолитических микроорганизмов в 1 м <sup>3</sup> воздуха	Кровяной агар Шоколадный агар	37 °С, 24–48 ч
Количество плесневых грибов в 1 м <sup>3</sup> воздуха	Среда Сабуро	24 °С, 48–72 ч

Питательные среды готовят по общепринятым методикам микробиологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя и разливают в контактные чашки Петри. Подготовленные контактные чашки с соответствующими средами могут храниться в холодильнике в течение 1 недели.

**Отбор проб воздуха**

Для подготовки прибора к работе производят дезинфекцию внутренней поверхности аспирационной насадки прибора. Применяемое средство должно быть предназначено для дезинфекции металлических поверхностей. Помещают подписанную закрытую контактную чашку с соответствующей питательной средой в насадку.

Проводят отбор проб воздуха согласно инструкции к применяемому аспиратору.

Параметры работы прибора выбирают в зависимости от предполагаемой степени контаминации воздушной среды. Обычно рекомендуется отбирать 200–500 л воздуха для аспирации.

После завершения отбора образца извлекают контактную чашку и помещают в термостат.

Инкубируют при режимах, указанных в таблице 1.

После инкубации подсчитывают колонии на поверхности питательной среды, затем делают пересчет результатов с учетом статистической вероятности умножения частиц, проходящих через одно отверстие, в соответствии с рекомендациями производителя аспиратора.

Полученные результаты далее используют для вычисления фактического показателя микробиологической контаминации воздуха по формуле:

$$X = \frac{P \cdot 1000}{V}, \quad (1)$$

где  $V$  — объем отобранного воздуха;

$P$  — число выросших на чашке колоний с учетом положительной коррекции;

$X$  — КОЕ в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

При оценке полученных результатов исследования целесообразно пользоваться следующими критериями:

Таблица 2

Критерии оценки результатов исследования

Оценка воздуха	Летний режим		Зимний режим	
	Общее число микроорганизмов в $1 \text{ м}^3$ воздуха	Количество гемолитических микроорганизмов в $1 \text{ м}^3$ воздуха	Общее число микроорганизмов в $1 \text{ м}^3$ воздуха	Количество гемолитических микроорганизмов в $1 \text{ м}^3$ воздуха
Чистый	1500	16	4500	36
Грязный	2500	36	7000	124

Количество плесневых грибов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха целесообразно изучать в динамике при оценке аллергизации детей.

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ОБЪЕКТОВ ШКОЛЬНОЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ОТПЕЧАТКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОТОВЫХ ПОДЛОЖЕК**

Исследования проводят по эпидемическим показаниям, оперативной необходимости (неудовлетворительное санитарное состояние, неудовлетворительные результаты предыдущих исследований).

Объектами для производства смывов в школьных учреждениях могут быть: поверхность обеденных столов, поверхность стола для раздачи пищи, руки учащихся, руки персонала, ручки дверей, подоконник, поверхность

столов для обработки вареных и готовых продуктов, разделочные доски для готовых продуктов, чистая посуда, кухонный инвентарь и т.д.

Подложки для микробиологического контроля полностью готовы к использованию, компактны, удобны в применении позволяют сократить время подготовки микробиологических исследований.

**Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

Готовые подложки для проведения микробиологических анализов.

Стерильный физиологический раствор.

Стерильные ватные тампоны.

Термостат.

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 20–100 °С с отклонением до 1 °С от заданной.

Автоклав по ГОСТ 19569-80.

Шкаф сухожаровой.

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками 2-го класса точности.

Пипетки вместимостью 1, 5, 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>.

pH-метр.

При оценке микробной контаминации объектов школьной среды целесообразно проводить исследования поверхностей и рук по следующим показателям:

Таблица 3

**Показатели для исследования микробной контаминации объектов школьной среды**

Показатель	Температура и время инкубации	Когда проводится	Допустимый уровень
Наличие бактерий группы кишечной палочки	37 °С 24–48 ч	При оценке эффективности дезинфекции для обработки поверхностей и рук	Отсутствие
Наличие Staphylococcus aureus	37 °С 48 ч	По эпидпоказаниям	Отсутствие
Наличие Salmonella	37 °С 24–48 ч	По эпидпоказаниям	Отсутствие

**Проведение исследований**

С помощью ножниц открывают фольгированный пакет с подложками, извлекают необходимое их количество. Край пакета с оставшимися подложками сгибают, фиксируют сгиб с помощью скрепки и помещают пакет в холодильник при температуре 2–8 °С.

С помощью пипетки наносят на подложку 1 мл стерильного физиологического раствора, закрывают подложку пленкой и дают раствору равномерно распределиться по подложке в течение 1–2 мин.

Снимают пленку с подложки, прижимают влажную подложку к исследуемой поверхности (рукам) или осторожно протирают поверхность. Закрывают подложку защитной пленкой и инкубируют в термостате в соответствии с показаниями таблицы 3. Для обработки результатов подсчитывают колонии, выросшие на поверхности питательной среды подложек.

При необходимости подтверждения таксономической принадлежности микроорганизмов проводят их изучение общепринятыми методами, включая окрашивание, микроскопирование, биохимические и серологические исследования.

## **ИМПЕДИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ВОДЫ**

Исследования проводят по эпидемическим показаниям, оперативной необходимости (неудовлетворительное санитарное состояние, неудовлетворительные результаты предыдущих исследований).

Использование методов импедансной технологии позволяет значительно ускорить получение результатов и повысить их точность и воспроизводимость, автоматизировать определение эпидемически значимых микробиологических показателей.

### **Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

Анализатор микробиологический.

Автоклав.

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 20–100 °С с отклонением до 1 °С от заданной.

Спиртовки стеклянные лабораторные.

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2-го класса точности (для взвешивания реактивов).

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, 4-го класса точности (для взвешивания продукта).

Чашки бактериологические стеклянные, тип Петри.

Пипетки вместимостью 1, 5, 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>.

Пробирки бактериологические.

pH-метр.

Лабораторный гомогенизатор, обеспечивающий равномерное измельчение пробы продукта в асептических условиях.

Лабораторный встряхиватель, обеспечивающий равномерное горизонтальное круговое перемешивание жидкости в пробирке.

Агар микробиологический.

Пептон сухой ферментативный бактериологический.

Спирт этиловый ректифицированный.

Натрий хлористый.  
Дрожжевой экстракт.  
Декстроз (D-глюкоза).  
L-орнитина гидрохлорид.  
Биселенит натрия.  
Дигидрат триметиламинооксида.  
Новобиоцин.

Готовые смеси (в соответствии с рекомендациями изготовителя анализатора, например, PCA (Plate Count Agar), MPCA, GPM Plus, CM, EM).

### **Приготовление растворов и питательных сред**

#### ***Раствор для приготовления разведений продуктов.***

##### *Пептонно-солевой раствор*

1,0 г пептона и 8,5 г хлористого натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды при медленном нагревании. Полученный раствор при необходимости фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН  $7,0 \pm 0,1$ , разливают в колбы по  $90 \text{ см}^3$ , в пробирки по  $9 \text{ см}^3$ . Стерилизуют автоклавированием при  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 20 мин.

##### *Модифицированная среда MOD (для выявления Salmonella)*

3,0 г дрожжевого экстракта, 1,0 г декстрозы, 5,0 г L-орнитина гидрохлорида, 2,0 г биселенита натрия растворяют в  $1000 \text{ см}^3$  дистиллированной воды, добавляют 1,0 г дигидрата триметиламина оксида, доводят рН до  $6,4 \pm 0,1$  и стерилизуют автоклавированием при температуре  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. Затем асептически добавляют стерильный раствор новобиоцина до конечной концентрации 0,15 мг на  $1000 \text{ см}^3$ .

*Питательные среды для работы на анализаторе* готовят согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Питательные среды двойной концентрации используют при анализе проб воды.

### **Отбор и подготовка проб**

Отбор и подготовка проб осуществляются по ГОСТ 26668-85, 26669-85. Отбор проб от продукции проводят по каждому виду отдельно. Пробы от продуктов отбирают асептическим способом, исключая микробное загрязнение продукта из окружающей среды. Общие правила отбора проб осуществляют по нормативно-технической документации на конкретный вид продукции.

#### ***Подготовка проб для калибровочных исследований***

Для калибровочных исследований готовят разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  исследуемого продукта на пептонно-солевом растворе. Затем от каждого разведения делают посев по 0,1 мл на 2 чашки Петри с соответствующей питательной средой. Из этих же разведений готовят пробы для заполнения ячеек анализатора (по 2 ячейки на каждое разведение) и инкубируют в соответствии с параметрами, рекомендуемыми производителем анализатора.

#### ***Подготовка проб для определения общего числа микроорганизмов***

##### *Мясные, рыбные изделия и изделия из птицы*

Гомогенизировать 10 г продукта с 90 мл пептонно-солевого или физиологического раствора. Внести в 2 ячейки среду GPM Plus по 1 мл.

Добавить в среду по 0,1 мл приготовленного гомогената продукта. Ячейки поместить для инкубации в термостат анализатора при 30 °С на 10–15 ч.

#### *Молочные продукты*

Гомогенизировать 10 г продукта с 90 мл пептонно-солевого или физиологического раствора. При анализе молока продукт непосредственно вносится в среду без стадии гомогенизации. Внести в 2 ячейки среду МРСА по 1 мл в каждую. Добавить в среду по 0,1 мл приготовленного гомогената продукта. Ячейку поместить для инкубации в термостат анализатора при 30 °С на 10–15 ч.

#### *Вода*

Внести в 2 ячейки среду МРСА двойной концентрации по 1 мл в каждую. Добавить в среду по 0,5 мл исследуемой воды. Ячейку поместить для инкубации в термостат анализатора при 30 °С на 10–15 ч.

*Подготовка проб для проведения теста на отсутствие БГКП (колиформы) в определенном количестве продукта (воды)*

Гомогенизировать 10 г исследуемого продукта с 90 мл среды СМ, затем сделать соответствующие разведения для получения массы продукта, в которой не допускается наличие БГКП (в соответствии с СанПиН 11-63 РБ-98). Полученную суспензию поместить в термостат при 35 °С для предварительного обогащения:

на 3 ч — для молочных продуктов,

на 4 ч — для мясных и рыбных продуктов.

После этого внести в 2 ячейки по 1 мл суспензии и поместить в термоинкубатор анализатора при 35 °С на 10–15 ч.

*Подготовка проб для проведения теста на отсутствие патогенных бактерий, в т. ч. Salmonella, в определенном количестве продукта*

Гомогенизировать 25 г исследуемого продукта с 225 мл пептонно-солевого раствора. Полученную суспензию поместить в термостат при 35 °С для предварительного обогащения 8–10 ч для неселективного обогащения. После этого посеы перемешивают взбалтыванием и асептически переносят по 0,1 мл в среду для селективного обогащения, приготовленную по 8.2, предварительно подогретую до 43 °С и разлитую в ячейки по 1 мл. Посев производится в двух повторностях. Ячейки инкубируют в термоинкубаторах анализатора при  $35 \pm 1$  °С в течение 12–24 ч.

#### **Интерпретация результатов**

Полученные параметры детектирования в виде времени детекции IDT являются основой для расчета общего микробного числа с помощью калибровочного файла. Отсутствие параметра времени детекции IDT позволяет судить об отсутствии колиформных или патогенных бактерий в определенном количестве продукта.

Микробиологические показатели качества пищевых продуктов и воды оцениваются в соответствии с действующими техническими нормативными правовыми актами.