



РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Міністэрства аховы здароўя
ГАЛОЎНЫ ДЗЯРЖАЎНЫ
САЇТАРНЫ ЎРАЧ
РЕСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Мінск, вул. Мяснікова, 39
факс 200-64-59 E-mail: mrimzha@belcmt.by

Телефон 222-69-97

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Министерство здравоохранения
ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Минск, ул. Мясникова, 39
факс 200-64-59 E-mail: mrimzha@belcmt.by

28» *января* 2006 г. № _____

На № _____

ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 7

Об утверждении Инструкции 4.2.10-22-1-2006
«Методы микробиологического контроля сани-
тарно-гигиенического состояния помещений в
организациях здравоохранения и стерильности
изделий медицинского назначения»

В целях исполнения Закона Республики Беларусь «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» в редакции от 23 мая 2000 года (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2000 г., № 52, 2/172) постановляю:

1. Утвердить прилагаемую Инструкцию 4.2.10-22-1-2006 «Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния помещений в организациях здравоохранения и стерильности изделий медицинского назначения» и ввести ее в действие на территории Республики Беларусь с 03 апреля 2006 г.

2. Главным государственным санитарным врачам областей и г. Минска довести данное постановление до сведения всех заинтересованных и установить контроль за его выполнением.

М.И. РИМЖА

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 № 7

ИНСТРУКЦИЯ 4.2.10-22-1-2006
«МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОМЕЩЕНИЙ В
ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СТЕРИЛЬНОСТИ
ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ»

ГЛАВА I
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, ра-

невые 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 I 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, вмонтированных 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 селективную 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$. 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$, 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$ 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 $(37-1)^{\circ}\text{C}$ 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$ 24 часа. Первичный учет проводят через 4-6 ч. 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$ 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 4мл среды Хью-Лейфсона или полужидкой среды Гисса с глюкозой, в одну из которых вносится 0,5 мл вазелинового масла. Посевы инкубируют при $(37+1)^{\circ}\text{C}$ 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, стерилизуемых 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 предбокснике 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 $(37+1)^{\circ}\text{C}$ 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 $5 \times 5 \text{ см}^2$, предварительно увлажненной стерильным физиологическим раствором или стерильной дистиллированной водой.

Перед посевом исследуемые образцы вносят в предбоксник, предварительно снимая наружную мягкую упаковку. В предбокснике 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 предбокснике, изделия во внутренней упаковке сразу переносят в бокс. Посевы на стерильность проводит бактериолог с помощью лаборанта.

ГЛАВА 5 ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, РЕАКТИВЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

22. Аппаратура и инструментарий:

	Нормативная документация (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений рН $\pm 0,01$	ГОСТ 19881-74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющих поддерживать температуру $(180 \pm 5)^{\circ}\text{C}$	ТУ 64-1-28-70-76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37°C с отклонением от заданной $\pm 1^{\circ}\text{C}$	ТУ 64-1-1382-72
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 24°C с отклонением от заданной $\pm 1^{\circ}\text{C}$	ТУ 64-1-1382-72
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-2001
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с	ГОСТ 19569-89Е
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535-84
Холодильник бытовой	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241-89Е
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239-93
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240-89
Штативы для пробирок	
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145-84Е
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
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82Е
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 29227-91
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336-82Е
Стекля предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672-75Е
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90Е
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932-90Е

24. Реактивы, компоненты сред:

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

Натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164-78
ТВИН-80	
Лецитин	
Натрий серноватистокислый (тиосульфат натрия)	ГОСТ 27068-86

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 (ГНЦ ПМ)
Питательная среда для выделения стафилококков сухая (стафилококкагар)	ФС (ГНЦ ПМ)
Питательная среда № 2 ГРМ для контроля микробной загрязненности сухая (для выращивания грибов Сабуро)	ВФС 42-3068-98 (ГНЦ ПМ)
Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо – ГРМ)	ВФС 42-3110-98 (ГНЦ ПМ)
Питательная среда для обнаружения бактерий группы кишечной палочки (среда Кесслера – ГРМ)	ФСП 42-0084019200 (ГНЦ ПМ)
Среды Гисса с маннитом и др.	ФС (ЦНИИВС им. И.И. Мечникова, НИИ питательных сред)

Основа агара с цетримидом без глицерина
(Cetrimide Agar Base w/o Glycerine)

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;
 рН 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 рН 8,0-8,2, кипятят, постоянно помешивая, до расплавления агара (5-10 минут). Можно автоклавировать 20 минут при 100°C, затем прибавляют горячую воду до первоначального объема, прибавляют глюкозу и тиогликолевую кислоту, фильтруют, устанавливают рН 7,2-7,3. Добавляют раствор резазурина, смешивают и разливают в стерильные пробирки по 20 мл. Стерилизуют 20 минут при 120°C.

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;
 рН среды после стерилизации 7,2-7,4.

Приготовление:

Смешивают все компоненты среды, кроме глюкозы, подщелачивают 10-20% раствором NaOH до рН 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 рН 7,3-7,5,

разливают в стерильные пробирки по 5 мл. Стерилизуют при 110-112°C (0,5 атм) в течении 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 110°C (0,5 кгс/кв.см – 30 минут).

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

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре 121±1°C. 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 45-50°C агару добавляют 20% желточной взвеси

(асептически извлеченный из яйца желток взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают агар с желточной взвесью, разливают по 20 мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике в течение 2-х недель.

Молочно-солевой агар.

К расплавленному и охлажденному до 45-50°C агару добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, смешивают и разливают среду в чашки Петри. Хранят в холодильнике не более 2-3-х дней.

МПА с фурагином.

К расплавленному и охлажденному до 45-50°C МПА добавляют фурагин из расчета 0,002 грамма на 100 мл. Стерилизуют при 112°C 30 мин.

Желчный бульон.

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

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

Кровяной агар.

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

Среда Хью-Лейфсона.

Пептон – 2 г;

Натрий хлорид – 5 г;

Калий гидрофосфат (K_2HPO_4) – 3 г;

Агар – 3 г;

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

Глюкоза – 10 г;

Вода дистиллированная – 1000 мл;

Приготовление: все ингредиенты растворяют при подогревании в водяной бане, фильтруют, разливают в пробирки по 5-6мл, стерилизуют при 110°C 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 1 г, спирт этиловый 96°C 10мл, фенол 2 г растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

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

Реактив 3. Спирт этиловый 96°C.

Реактив 4. Фуксин феноловый, разведенный: а) Фуксин основной 10г, спирт этиловый 96°C 100 мл, ингредиенты смешивают и ставят в тер-

мостат на 18-20 часов, б) Фенол 5 г, вода дистиллированная 10 мл. Смешивают 10 мл раствора фуксина и 100 мл фенолового раствора, для работы разводят дистиллированной водой 1:10.

28. Нейтрализатор:

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

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

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 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ на 48 часов.

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

Тиогликолевую среду выдерживать при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ до использования не допускается, поэтому от каждой серии отбирают 1% от общего числа пробирок или колб и выдерживают их в термостате при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48ч. Для контроля стерильности эту часть сред не используют.

Приложение 1
к Инструкции 4.2.10-22-1-2006
«Методы микробиологического
контроля санитарно-
гигиенического состояния
помещений в организациях здраво-
охранения и стерильности изделий
медицинского назначения»

Критерии оценки микробной обсемененности воздуха

Наименование объекта	Условие работы	Общее количество бактерий КОЕ/м ³	Количество St.aureus КОЕ/м ³
операционные, процедурные, перевязочные, послеоперационные и реанимационные палаты	до начала работы	не более 500	отсутствие

Приложение 2
к Инструкции 4.2.10-2-1-2006
«Методы микробиологического
контроля санитарно-
гигиенического состояния
помещений в организациях здра-
воохранения и стерильности изде-
лий 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

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. 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.).

2. Настоящая Инструкция утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 28 января 2006г. № 7.

3. 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».