ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 70152— 2022

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Российской ассоциацией водоснабжения и водоотведения (РАВВ) совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 343 «Качество воды»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 июня 2022 г. № 483-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Организация внутреннего контроля качества на всех этапах выполнения микробиологического и паразитологического анализа 2
5 Контроль физических параметров окружающей среды 4
6 Требования к подготовке лабораторной посуды 10
7 Санитарно-микробиологический контроль воздуха 13
8 Санитарно-паразитологический контроль воздуха в паразитологической лаборатории 15
9 Методы исследования микробной и паразитарной обсемененности поверхностей 16
10 Порядок проведения контроля качества осуществления стерилизации и обеззараживания 18
11 Порядок проведения контроля за питательными средами 22
12 Правила приготовления серийных разведений 29
13 Этапы сохранения микробиологических культур 30
Приложение А (рекомендуемое) Примеры формуляров для записи результатов контроля 38
Приложение Б (обязательное) Методы санитарно-паразитологического исследования смывов с поверхностей, воздуха и пыли для проведения внутрилабораторного контроля 44
Приложение В (обязательное) Расчет достоверности различий средних значений количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой средах по Стьюденту-Фишеру . . . 49
Библиография 51

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований

Water quality. Methods of internal laboratory quality control for conducting microbiological and parasitological studies

Дата введения — 2023—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт предназначен для осуществления внутреннего лабораторного контроля с целью оценки достоверности полученных результатов при проведении бактериологических, вирусологических, микологических и паразитологических исследований объектов окружающей среды, в том числе воды централизованного горячего и холодного, нецентрализованного и хозяйственно-бытового водоснабжения, воды, расфасованной в емкости, источников питьевого водоснабжения, воды в зонах рекреации, воды бассейнов и аквапарков, сточных и технических вод, воды для орошения и полива.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 18963 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа

ГОСТ 24849 Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 30813 Вода и водоподготовка. Термины и определения

ГОСТ 31942 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

ГОСТ 31955.1 (ISO 9308-1:2000) Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет Escherichia coli и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ 34786 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ Р ИСО 15882 Стерилизация медицинской продукции. Химические индикаторы. Руководство по выбору, использованию и интерпретации результатов

ГОСТ Р ИСО 21748 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана

Издание официальное

датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 30813, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бокс (боксированное помещение):** Специальным образом устроенное изолированное помещение, состоящее из собственно бокса и предбокса, предназначенное для создания асептических условий при проведении исследований, а также для предотвращения микробного загрязнения внешней среды.

3.2 **бокс биологической безопасности (ламинарное укрытие, ламинарный шкаф):** Конструкция, используемая для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды.

3.3 **запас рабочей культуры:** Культура эталонного штамма в условиях временного хранения в полужидком агаре при температуре от 4 °С до 8 °С.

3.4 **запас эталонного штамма:** Штамм, находящийся в условиях длительного хранения при температуре минус (70 ± 10) °С или в жидком азоте.

3.5 **лиофилизированная культура:** Высушенная под вакуумом из замороженного состояния культура эталонного штамма.

3.6 **культура для целевого использования:** Культура эталонного штамма, прошедшая не более 2 пассажей после высева со среды временного хранения (из запасов рабочей культуры), предназначенная для использования в анализе.

3.7 **контрольные процедуры:** Действия и мероприятия, направленные на минимизацию рисков на всех этапах выполнения микробиологического и паразитологического анализа.

3.8 **патогенные биологические агенты;** ПБА: Патогенные для человека микроорганизмы, генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также материал, подозрительный на содержание перечисленных агентов (включая биологические жидкости и объекты окружающей среды).

3.9 **посевная:** Рабочее помещение, предназначенное для выполнения первого этапа санитарно-микробиологического исследования воды: концентрирования, разведения и/или посева в питательные среды.

3.10 **посевная доза:** Объем конкретного разведения, содержащий необходимое для посева количество жизнеспособных клеток тестового микроорганизма.

3.11 **разбавитель:** Жидкость определенного состава, служащая для приготовления серийных разведений исследуемой воды или модельных бактериальных культур.

3.12 **субкультура:** Культура бактерий, полученная путем пассажа через полноценные питательные среды.

3.13 **испытательное оборудование:** Средство испытаний, представляющее собой техническое устройство для воспроизведения условий испытаний.

3.14 **вспомогательное оборудование:** Оборудование, предназначенное для обеспечения работоспособности основного оборудования, не участвующее в исследованиях.

3.15 **измерительное оборудование:** Средства измерений, в том числе эталоны единиц физических величин, стандартные образцы, программное обеспечение (кроме входящего в состав средств измерений) и вспомогательная аппаратура или их комбинации, необходимые для реализации процесса измерений.

4 Организация внутреннего контроля качества на всех этапах выполнения микробиологического и паразитологического анализа

4.1 Основными направлениями организации внутреннего контроля качества являются:

- контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т. д.);

- выполнение регламентированных процедур ведения тестовых культур;
- контроль качества питательных сред;
- контроль качества мембранных фильтров и фильтрующих материалов для микробиологического анализа;
- контроль качества дистиллированной воды;
- систематическая оценка результатов контрольных процедур, выполняемых в соответствии с планом внутрилабораторного контроля.

4.2 Описание процедур контроля соблюдения требований к условиям проведения анализа, ведения эталонных бактериальных культур, контроля качества питательных сред и мембранных фильтров, постановки положительных и отрицательных контролей представлены в настоящем стандарте.

4.3 Документальное оформление результатов проведенных контрольных процедур осуществляется в произвольной форме, удобной исполнителю и наглядной для других специалистов, привлекаемых к участию в различных комиссиях по проверке работы лаборатории (по аттестации, аккредитации и др.). При этом могут быть использованы журнальные формы учета или формы отдельных контрольных листов, которые впоследствии брошюруются за определенный период времени (месяц, квартал, год) в зависимости от кратности и вида контроля. Примеры формуляров для записи результатов внутреннего контроля качества приведены в приложении А.

4.4 Регистрация и хранение контрольных результатов могут осуществляться на электронных носителях.

4.5 Обязательным разделом внутреннего контроля качества является проведение периодического, но не реже 1 раза в год, анализа результатов выполненных контрольных процедур, с учетом которого осуществляется корректировка мероприятий, направленных на повышение качества внутрилабораторного контроля.

4.6 Обеспечение качества выполняемых исследований возможно только при наличии квалифицированного персонала. К выполнению всех технологических операций (подготовка проб, исследование и обработка результатов) допускаются лица с высшим или средним специальным образованием, прошедшие подготовку (обучение) периодичностью один раз в пять лет по специальностям, отвечающим требованиям и характеру работ, в области микробиологии (бактериологии, вирусологии, микологии) и паразитологии, а также один раз в пять лет курс повышения квалификации кадров по безопасности работы с ПБА III—IV группы патогенности (опасности) в соответствии с действующими на территории Российской Федерации санитарными правилами и нормами. Проверку квалификации работающего персонала необходимо проводить в соответствии с разработанным в лаборатории и утвержденным в организации планом производственного контроля.

4.7 Требования к набору помещений и их размещению, организации и безопасности работ микробиологических лабораторий с патогенными биологическими агентами изложены в [1].

4.8 Во избежание загрязнения проб и питательных сред, а также риска инфицирования персонала в лаборатории следует соблюдать меры личной гигиены:

- лабораторная одежда должна быть застегнутой надлежащим способом, чистой, в хорошем состоянии, изготовленной из ткани, ограничивающей риск воспламенения. Эту одежду не следует носить вне рабочей зоны и, в частности, в ней нельзя выходить в туалет;
- на волосяной покров головы следует надевать медицинскую шапочку из хлопчатобумажной ткани или одноразовую из нетканого материала. На лицо, при необходимости, надеть маску или защитный экран/очки;
- ногти следует содержать в чистоте и желательно короткими;
- необходимо мыть руки теплой водой желательно в раковине, оснащенной не регулируемым вручную смесителем (например, с локтевым, ножным или сенсорным управлением), до и после микробиологических исследований, а также после посещения туалета. Рекомендуется использовать жидкое или порошковое мыло, или другое дезинфицирующее средство, поступающее из дозатора, поддерживаемого в чистом состоянии. Для сушки рук следует использовать одноразовые бумажные или матерчатые салфетки или полотенца;
- при работе с открытыми пробами, питательными средами и при посеве материала не допускается разговаривать, кашлять и т. д.;
- люди, имеющие инфекционные заболевания кожи или страдающие заболеваниями кожи, должны предпринимать меры предосторожности, если микроорганизмы от них способны инфицировать пробы, что может отразиться на результатах исследований;

- в лаборатории нельзя принимать пищу, пить, оставлять пищевые продукты для личного потребления в лабораторных холодильниках или морозильных камерах;
- недопустимо осуществлять пипетирование ртом.

5 Контроль физических параметров окружающей среды

5.1 Условия окружающей среды помещений лаборатории не должны оказывать негативного воздействия на достоверность результатов, полученных в результате исследований. Лабораторные помещения содержать в состоянии, пригодном для проведения исследований, уборку и дезинфекцию следует выполнять постоянно. Загрязненные или потенциально зараженные поверхности следует продезинфицировать, для чего необходимо использовать дезинфицирующие средства, обладающие способностью уничтожать бактерии, вирусы, паразитарные агенты и грибы.

Примечание — Комнаты и оборудование могут быть продезинфицированы с использованием «холодного тумана» — путем распыления воздуха со взвешенными в нем частичками дезинфицирующей жидкости, при этом дезинфекционное облако распространяется по обрабатываемой площади, проникая в щели и труднодоступные места.

Обеззараживание системы вентиляции с фильтрами следует проводить 2 раза в год.

Техническое обслуживание системы вентиляции следует проводить 1 раз в год, при необходимости, с заменой фильтров на новые.

5.2 В лаборатории должен осуществляться мониторинг физических параметров условий окружающей среды (температуры, влажности).

Перечень параметров определяется индивидуально каждой лабораторией и зависит от технических требований к эксплуатируемому оборудованию и применяемых методов. Данные параметры измеряются приборами, зарегистрированными в Госреестре, которые должны проходить ежегодную поверку в аккредитованных организациях.

Проводить измерения физических параметров (температура, влажность) должен подготовленный сотрудник, который прошел соответствующее обучение. Возможно привлечение сотрудников не из штата лаборатории, допуск которого оформляется приказом по организации. Измерения проводят в начале рабочего дня в посевных, комнате приготовления питательных сред и в помещениях, где хранятся сухие среды, и где этого требуют технические условия применяемых методов и методик.

Результаты мониторинга должны быть задокументированы в журналах (формулярах) и подписаны сотрудником, проводившим измерения.

5.3 В лабораториях должны осуществлять мониторинг источников УФ излучения и оценки эффективности УФ бактерицидного излучения. Мощность бактерицидного излучения определяет качество обеззараживания воздуха. Количество облучателей и эффективность их функционирования определяют мощность бактерицидного излучения [2].

Бактерицидным действием обладает ультрафиолетовое излучение с диапазоном длин волн 205—315 нм и УФ-дозы от 28 мДж/см^2 и выше, обеспечивающие снижение концентрации общего микробного числа (ОМЧ), Staphylococcus aureus, плесневых и дрожжевых грибов.

Количество облучателей определяется при организации лаборатории для каждого помещения в соответствии с Паспортом облучателя, объемом помещения и требованиями актуальной нормативной документации, действующей на территории РФ.

В каждом помещении, где используются УФ облучатели, должен вестись журнал (формуляр), в котором фиксируют паспортные данные лампы, ее ресурс, объем облучаемого помещения, дату начала эксплуатации, учет времени работы лампы. Осуществляют замену после выработки ресурса лампы. Отмечают также дату протирки лампы, проводимую не менее 1 раза в месяц только при отключенной сети.

Методика оценки эффективности применения ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях осуществляется путем проверки микробной обсемененности помещений, описанной в 7.2.

Если после облучения помещения на чашке МПА при седиментационном методе, вырастает не более 3 колоний, а при использовании аспирационного метода — не выше 500 КОЕ/м^3 — ультрафиолетовое облучение помещения считают эффективным.

Если нормативы превышены, то выполняют генеральную уборку помещения с обработкой всех поверхностей дезинфицирующими средствами и повторно обеззараживают воздух УФ облучением.

Затем проводят повторное исследование микробной обсемененности воздуха.

При получении неудовлетворительных результатов контроля ставят в известность руководителя лаборатории и принимают меры по выяснению причин недостаточной эффективности обеззараживания.

Если при повторном определении уровень обсемененности воздуха снова превышает нормативы, определяют бактерицидную эффективность облучения.

Результативность облучения микроорганизмов или бактериальная эффективность облучения $J_{бк}$ оценивается в процентах по формуле:

$$J_{бк} = \frac{N_п}{N_н} \cdot 100\ \%, \quad (1)$$

где $N_п$ — число погибших микроорганизмов;

$N_н$ — число микроорганизмов до облучения.

Применение ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха считают эффективным, если бактерицидная эффективность составляет не менее 99 %.

5.4 Контроль температуры в термостате (испытательном оборудовании) осуществляют с помощью одного термометра или с помощью записывающих тонкопроволочных термопар, позволяющих фиксировать выход температуры инкубации за границы допустимого отклонения. Контроль температуры в термостатах проводят ежедневно до начала работы поверенными термометрами и результаты фиксируются в журнале (формуляре). С этой целью каждый термостат должен включать не менее одного термометра, шарик которого погружен в глицерин (или в другую подходящую теплопоглощающую жидкость). Можно использовать другие системы проверки работы с равноценными характеристиками. Цена деления термометра не должна превышать четверти величины допустимого отклонения температуры инкубации. Так, для контроля температуры (36 ± 2) °С необходимо использовать термометр с ценой деления не более 0,5 °С. Термометр размещают в центре камеры термостата. Если в процессе аттестации были выявлены экстремальные точки, то термометры размещают в этих точках. В журнале (формуляре) для каждого термостата должно быть указано помещение, в котором находится оборудование, номер термостата, номер термометра, требуемый температурный режим и допустимые отклонения. В журнале (формуляре) отмечается дата учета и обработка термостата. Все записи заверяются подписью исполнителя.

Раз в месяц термостаты очищают и проводят санитарную обработку внешних и внутренних стенок термостата и, если необходимо, удаляют пыль из системы вентиляции или по инструкции производителя.

5.5 Проверка температуры в холодильниках проводится поверенными средствами измерения — термометрами ежедневно в каждой камере, используя термометр или постоянно установленный датчик. Результаты фиксируются в журнале (формуляре) и заверяются подписью исполнителя. Там же фиксируются даты санитарной обработки внутренних поверхностей холодильника. Точность, требуемая для контролирующего температуру устройства, зависит от цели, с которой эта камера используется.

При загрузке холодильных камер для поддержания циркуляции воздуха и во избежание перекрестного загрязнения используют разные камеры, контейнеры.

Примечание — Стоит обратить внимание, что в холодильниках, оснащенных электронным табло, бывает, что температура на табло и внутри камеры по показаниям термометра отличаются.

5.6 Температуру каждой морозильной камеры и установки для глубокого замораживания проверяют утром и вечером, используя подходящие устройства, контролирующие температуру, 1 раз в месяц — удаляют пыль с лопастей мотора и с внешних пластин термообменника (если возможно). Если морозильные камеры и установки для глубокого замораживания имеют встроенные устройства измерения температуры, информация с которых выводится на лицевую панель устройства, то достаточно контролировать температуру внешним термометром 2 раза в год и после разморозки и очистки холодильника для контроля работы встроенного термометра.

5.7 Контроль бани с терморегулятором требуется для поддержания необходимой температуры, обеспечивающей максимально допустимое отклонение, устанавливающегося для каждого используемого метода.

Перед началом работы баню необходимо заполнить жидкостью, предпочтительно следует использовать дистиллированную или деионизированную воду. Регулярно проверяют уровень жидкости, чтобы обеспечить правильное функционирование бани и надлежащее погружение помещенных в нее проб. Уровень жидкости должен всегда закрывать нагревательные элементы. Следует регулярно выливать жидкость из бани, очищать, санировать и снова заполнять баню жидкостью, в зависимости от частоты использования, а также после того, когда происходит разбрызгивание или протекание бани.

5.8 Микроволновая печь применяется для подогрева и плавления питательных сред и различных гелей, должна обеспечивать нагревание жидкостей и питательных сред в контролируемых условиях с помощью цикла микроволнового излучения.

Примечание — Не допускается нагревание сред, содержащих чувствительные к высокой температуре компоненты, если не проверено, что этот способ нагревания не оказывает влияния на свойства среды. Не допускается использовать микроволновые печи для стерилизации питательных сред. Не допускается использовать металлическое оборудование, включая металлические крышки.

5.9 Весы, используемые в микробиологической лаборатории для взвешивания, должны быть требуемого диапазона, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ, должны проходить ежегодную поверку как средство измерения. Если нет других указаний, разрешающая способность весов должна быть не более 1 %, чтобы обеспечить максимальную допустимую погрешность 5 % по массе.

Оборудование устанавливают на устойчивую горизонтальную поверхность с защитой от вибраций.

Оборудование очищают и дезинфицируют после каждого использования или после проливания (рассыпания) при взвешивании с помощью подходящего не коррозирующего дезинфицирующего средства.

Обученный оператор должен проводить калибровку весов в соответствии с технической документацией на них.

5.10 pH-метр должен обеспечивать считывание показаний до ± 0,01 ед. pH, а погрешность измерений должна составлять 0,1 ед. pH. Он должен быть оснащен ручным или автоматическим определителем температуры.

pH-метр регулируют в соответствии с инструкцией изготовителя для измерения значения pH при стандартизированной температуре, например 25 °С. Значение pH считывают после того, как стабилизируется показание. Калибровку pH-метра проводят в соответствии с инструкцией производителя, используя не менее двух, а лучше трех стандартных буферных растворов перед началом работы. При этой проверке определяют максимально допустимые погрешности, которые должны быть более строгими, чем погрешность, допустимая при обычном использовании. Буферные растворы должны быть прослеживаемыми и иметь значения pH, определяемые с точностью до двух знаков после запятой при температуре измерения (как правило, pH 7,00, pH 4,00 и/или pH 9,00 при 25 °С, в соответствии с инструкцией изготовителя).

Измеряемое значение pH должно находиться между значениями pH стандартных растворов.

Значение pH записывают с точностью до двух знаков после запятой в соответствующий журнал (формуляр).

Значение водородного показателя измеряют у стерилизованной среды, а при работе с плотной средой — измеряют у стерилизованной среды после ее отвердения. При измерении pH для контроля питательных сред применяют индикаторную бумагу с шагом 0,3 ед.

Отклонение pH среды за пределы диапазона, указанного в паспорте, приводит к ухудшению ее биологических свойств, вплоть до полной непригодности. Отклонения водородного показателя или другие проблемы с pH могут быть вызваны: перегревом; недостаточным перемешиванием; чрезмерной стерилизацией; использованием щелочного стекла; загрязнением емкостей, в которых готовилась среда; дистиллированной водой низкого качества.

5.11 Процедура подготовки к работе и контроля стерильности фильтровальных установок при проведении микробиологических исследований воды

5.11.1 Процедура подготовки к работе и контроля стерильности фильтровальных установок при проведении бактериологических исследований воды

Воронки и фритты обжигают фламбированием с применением пинцета с ватой или марлей, смоченной 96 %-ным спиртом и отжатой, или с применением ручной горелки.

Обеззараживание фильтровальной установки проводится после каждого проведения концентрирования пробы воды.

Контроль стерильности фильтровальных установок проводят перед началом посева методом мембранной фильтрации.

Подготовительный этап

Для контроля используют:

- плотную полноценную неселективную среду (питательный агар, ГРМ-агар и др.) проверенной ранее серии (раздел 11);
- стерильные мембранные фильтры (нитрат- или ацетат-целлюлозные) для микробиологических целей с диаметром пор 0,45 мкм, проверенной ранее партии (5.12);
- стерильную водопроводную воду;
- спирт-ректификат 96%-ный.

Накануне исследования питательный агар проверенной серии разливают в чашки Петри слоем не менее 2 мм и проверяют на стерильность. Для этого одну чашку из приготовленной среды инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. При наличии роста микроорганизмов приготовленную среду выбраковывают.

Методика контроля

На воронках должны быть нанесены риски, определяющие объем фильтруемой жидкости. Внутренние поверхности воронки и фильтровальный столик смачивают 96%-ным спиртом и фламбируют. После сгорания спирта и остывания воронок с помощью стерильного пинцета помещают мембранный фильтр на основание держателя фильтра, затем устанавливают фильтровальную воронку в гнездо фильтровального столика. Допускается фламбирование фильтровального столика и внутренней поверхности воронки газовым пистолетом.

При отключенном вакууме воронку заполняют стерильной водой таким образом, чтобы вода обмыла внутренние стенки воронки. Объем стерильной воды должен составлять не менее половины максимального объема воронки.

Включают вакуум и отфильтровывают содержимое воронки. Вакуум отключают, снимают фильтровальную воронку и стерильным пинцетом переносят мембранный фильтр с основания на чашку со средой. Между мембранным фильтром и поверхностью агара не должно быть пузырьков воздуха. Чашки с посевами переворачивают и инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч.

Рост микроорганизмов свидетельствует о неэффективной обработке фильтровальной установки. Результаты заносят в журнал контроля стерильности фильтровальных установок и визируют подписью сотрудника, выполнившего контроль. Обо всех случаях нестерильности фильтровальных установок ставят в известность руководителя подразделения.

5.11.2 Процедура подготовки к работе и контроля стерильности фильтровальных установок при проведении вирусологических исследований воды

Обработка фильтровальной установки

Обеззараживание фильтровальной установки проводится после каждого проведения концентрирования пробы воды.

Для контроля полноты обеззараживая через шланги и установку предварительно пропускают 10 $см^3$ суспензии непатогенного биологического трейсера — РНК-содержащего колифага MS-2 в концентрации 10^3 БОЕ/$см^3$.

Обеззараживание фильтровальной установки проводится следующим способом: через шланги и фильтровальную установку пропускают 1 л 10 %-ного раствора перекиси водорода, затем 500 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, которой производится смыв остаточного раствора перекиси водорода. После этого производится фломбирование фильтродержателя.

Контроль стерильности фильтровальных установок проводят перед началом концентрирования методом смыва непатогенного биологического трейсера дистиллированной водой.

Подготовительный этап

Для контроля используют:

- плотную полноценную неселективную среду МПА проверенной ранее серии (раздел 11);
- культуру E. coli $K12F^+Str^r$;
- стерильную дистиллированную воду.

Накануне исследования питательный агар проверенной серии разливают в чашки Петри слоем не менее 2 мм и проверяют на стерильность. Для этого одну чашку из приготовленной среды инкубируют

при температуре 37 °С в течение 24 ч. При наличии роста микроорганизмов приготовленную среду выбраковывают.

Методика контроля

Для оценки стерильности фильтровальной установки и ее готовности для концентрирования новой пробы воды, производится пропускание 1 л стерильной дистиллированной воды через установку и шланги с последующим посевом 10 $см^3$ в 3-х повторностях на наличие фага MS-2 титрационным методом определения колифагов.

Обнаружение в пробе колифагов свидетельствует о неэффективной обработке фильтровальной установки. В случае обнаружения фагов обеззараживание фильтродержателя производятся повторно с последующим контролем. Результаты заносят в журнал контроля стерильности фильтровальных установок и визируют подписью сотрудника, выполнившего контроль. В случаях выявления нестерильности фильтровальных установок ставят в известность руководителя подразделения, и результаты проведенных исследований, проведенные с использованием данной нестерильной фильтровальной установки, считаются не действительными.

5.11.3 Процедура подготовки к работе и фильтровальных установок при проведении паразитологических исследований воды проводится согласно рекомендациям производителя.

Пример — При проведении паразитологических исследований могут использоваться вакуумные фильтровальные установки типа ПВФ-142, ПВФ-142Б, ПВФ-142Б(К), ПВФ-35, ПВФ-47, ПВФ-142П, установки напорного фильтрования типа ПНФ-70, УППВ.

5.12 Контроль эффективности фильтрующих материалов для проведения санитарно-микробиологических и санитарно-паразитологических исследований

В практике лабораторий, проводящих санитарно-вирусологический контроль воды, используются позитивно-заряженная микропористая капроновая мембрана с диаметром пор 0,2 мкм, подготовленная к использованию согласно с указаниями организации-изготовителя (листовка-аннотация, сопровождающая фильтры).

В практике лабораторий, проводящих санитарно-паразитологический контроль воды, используют трековую мембрану, на основе ацетатов целлюлозы типа МФАС-СПА с размерами пор от 2,5 до 3,0 мкм, МФАС-СПА-4 с размерами пор от 2,5 до 4,5 мкм или прозрачные аналитические трековые мембраны АТМ на основе полиэтилентерефталата с размерами пор от 1,5 до 4,5 и более мкм. Диаметр фильтровальных дисков 25, 35, 47, 70 и до 142 мкм, в зависимости от диаметра фритты фильтродержателя используемого фильтровального оборудования. Специальная подготовка для трековых мембран не требуется, так как трековая мембрана находится между бумажными прокладочными дисками, изготовленными из силиконизированной бумаги. Трековые мембраны извлекают пинцетом из заводской упаковки и помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования (диаметр диска трековой мембраны подбирают в зависимости от имеющейся в лаборатории фильтровальной установки).

В практике лабораторий, проводящих санитарно-бактериологический контроль воды, используются фильтрующие материалы диаметром 47 или 35 мм и средним размером пор 0,45 мкм.

Фильтрующие материалы применяются при определении санитарно-бактериологических показателей, определяемых при контроле качества различных вод в соответствии с [3] с применением методов по ГОСТ 31955.1, ГОСТ 34786 и 6.4.1 настоящего стандарта:

- обобщенные колиформные бактерии;
- E. coli;
- энтерококки;
- P. aeruginosa;
- споры сульфитредуцирующих клостридий.

Качество используемых фильтрующих материалов может оказать существенное влияние на результаты анализа. При этом качество фильтрующих материалов одного производителя может меняться от партии к партии. При поступлении каждой новой партии фильтров, а также при необходимости принятия решения о возможности продления сроков годности осуществляется контроль эффективности фильтрующих материалов.

При наличии в поступившей партии нескольких серий фильтров контроль проводится для каждой серии.

Фильтрующие материалы, допущенные к проведению анализа, используются однократно. Повторное применение фильтрующих материалов запрещается.

Принцип метода

Эффективность фильтрующих материалов определяется путем сравнения числа колоний микроорганизмов, выросших на полноценной питательной среде в результате прямого поверхностного посева суспензии культуры контрольного микроорганизма, и числа колоний, выросших на этой же среде в результате посева способом мембранной фильтрации.

Оценка эффективности фильтрующих материалов осуществляется по показателю «процент извлекаемости». Фильтрующие материалы считаются пригодными, если при посеве способом мембранной фильтрации вырастает не менее 80% от числа колоний, полученных при прямом посеве.

Отбор фильтров для контрольного исследования должен проводиться «слепым» методом, т. е. фильтры для контроля необходимо отбирать произвольно из разных упаковок анализируемой партии.

5.13 Все автоматические дозаторы должны проходить ежегодную поверку в соответствии с описанием типа СИ.

5.14 Центрифуги, используемые для микробиологических и паразитологических исследований в качестве испытательного оборудования, аттестуют один раз в два года на скорость вращения, таймер, температуру для центрифуг с охлаждением, а также после ремонта проводят повторную аттестацию. Центрифугам, используемым в качестве вспомогательного оборудования, проводят техническое обслуживание, согласно рекомендациям производителя. Каждая лаборатория самостоятельно определяет принадлежность оборудования к испытательному и вспомогательному исходя из методов, которые в ней реализуются.

5.15 Аппарат для приготовления питательных сред разработан для стерилизации больших объемов сред (более 1 $дм^3$). Для контроля необходимо проверять температуру и продолжительность каждого цикла с фиксацией в журнале, возможно прикрепление чека с автоматическим считыванием параметров.

5.16 Проведение контроля в боксах биологической безопасности для микробиологических исследований

5.16.1 Бокс биологической безопасности для микробиологических исследований — это рабочее помещение, оснащенное установкой для горизонтального и вертикального ламинарных потоков воздуха, предназначенной для удаления пыли и других частиц из воздуха, в том числе микроорганизмов. Максимально допустимое количество частиц в кубическом метре с размером не менее или равным 0,5 мкм представляет класс устранения пыли из защитного бокса с очисткой воздуха. Для боксов, используемых в микробиологии пищевых продуктов, количество частиц должно быть не более 4000 в кубическом метре.

5.16.2 Для проведения микробиологических исследований допускаются боксы биологической безопасности не ниже II класса. Если это определено национальными регламентами, боксы биологической безопасности используют для любых видов работы с патогенными микроорганизмами. Боксы не должны загромождаться оборудованием. Все необходимое размещают до начала работы внутри бокса, чтобы свести к минимуму количество движений рук внутри и вне рабочей зоны. Расположение оборудования и материалов должно быть таким, чтобы свести к минимуму нарушение потока воздуха в рабочей зоне. Операторы должны быть обучены правильному использованию боксов, чтобы обеспечивать как их безопасность, так и сохранность пробы или культуры микроорганизмов.

5.16.3 После использования рабочую зону бокса очищают и обеззараживают с помощью соответствующего, не обладающего коррозийными свойствами, дезинфицирующего средства.

Боксы биологической безопасности следует дезинфицировать перед заменой фильтра или плановым обслуживанием.

После очистки бокса для обеззараживания можно использовать ультрафиолетовые (УФ) лампы. УФ лампы раз в месяц протирают 70 %-ным спиртом или заменяют в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.16.4 В процессе эксплуатации бокса биологической безопасности необходимо проверять эффективность бокса на биологическую безопасность при закупке и затем в соответствии с рекомендациями изготовителя, но не реже 1 раза в год, а также после любого ремонта или модификации. Проверку чистоты рабочей поверхности и стен бокса от любого микробиологического загрязнения следует проверять не реже 1 раза в месяц с соответствующей записью в лабораторном журнале, необходимо осуществлять перед каждой работой в боксе проверку числа микроорганизмов, циркулирующих в воздухе во время работы фильтров, используя метод седиментации.

6 Требования к подготовке лабораторной посуды

6.1 Процедура подготовки лабораторной посуды к работе

В настоящем стандарте устанавливается порядок проведения и контроля подготовки стеклянной посуды многоразового использования в соответствии с требованиями ГОСТ 31942.

Стерилизованная посуда должна иметь маркировку с указанием даты стерилизации для последующего учета срока хранения.

Емкости для отбора проб питьевой воды, обеззараженной хлорированием или другими окислителями, должны быть стерилизованы с тиосульфатом натрия и соответствующим способом маркированы в соответствии с ГОСТ 24849.

Подготовка лабораторной посуды проводится в моечной, расположенной в «чистой» зоне.

Процесс подготовки дает возможность получить чистые и стерильные флаконы, бутылки, пипетки, чашки Петри и др.

Одним из факторов, оказывающих влияние на результаты проводимых исследований воды, является недостаточная чистота посуды, поэтому вся посуда должна быть перед стерилизацией тщательно вымыта и высушена в соответствии с ГОСТ 18963.

Под механическими включениями подразумеваются посторонние нерастворимые частицы или волокна, видимые невооруженным глазом в смывах с внутренней поверхности стерильной лабораторной посуды.

Под стерильностью посуды подразумевается отсутствие микроорганизмов на их поверхностях после стерилизации.

Вся лабораторная посуда, вышедшая после проведения исследования (чашки, колбы, пробирки со средами), помещается в специальные биксы или ведра с крышками и обеззараживается автоклавированием при температуре (126 ± 2) °С и давлении 0,15 МПа в течение 60 мин или при температуре (132 ± 2) °С и давлении 0,2 МПа в течение 20 мин с момента достижения указанной температуры; при росте споровой микрофлоры — при температуре (132 ± 2) °С и давлении 0,2 МПа в течение 90 мин с момента достижения указанной температуры. Категорически запрещается освобождать использованную посуду от содержимого (питательных сред, растворов с посевами) до обеззараживания.

Перед стерилизацией посуда для микробиологического анализа должна быть тщательно вымыта и высушена. Посуду стерилизуют в сушильном шкафу сухим жаром одним из способов:

- при температуре (180 ± 3) °С — в течение 1 ч с момента достижения указанной температуры;
- при температуре (160 ± 5) °С — в течение 2,5 ч с момента достижения указанной температуры.

Материалы и лабораторную посуду, разрушающиеся при температуре от 160 °С до 180 °С (резина и т. п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре (121 ± 3) °С в течение 20 мин.

В исключительных случаях допускается обеззараживание кипячением в 2 %-ном растворе пищевой соды или 0,5 %-ном растворе нейтрального моющего средства в течение 60 мин с момента закипания. Кипячение должно происходить в закрытой емкости с полным погружением в раствор.

Отработанные пипетки обеззараживают с полным погружением в дезраствор. Продолжительность обеззараживания зависит от применяемого дезсредства.

Методика проверки эффективности обработки стеклянной лабораторной посуды: качество промывки лабораторной посуды от моющих средств и подбора режима мытья посуды при использовании нового моющего средства оценивают посредством визуального осмотра и по оценке наличия щелочных и кислых остатков, проверяемых посредством определения pH, которое должно быть в пределах диапазона 5,0—7,3.

Лабораторную посуду (флаконы, пробирки, бутылки, колбы) закрывают силиконовыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный (из фольги) колпачок.

Бумажный колпачок обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом.

Чашки Петри, пипетки стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах.

При использовании специальной лабораторной посуды и расходных материалов (флаконов с завинчивающимися пробками, металлических или силиконовых колпачков, выдерживающих автоклавирование, микробиологических пробок многоразового использования и других материалов) следует руководствоваться рекомендациями производителя.

После стерилизации посуду хранят до использования в закрытом шкафу или ящиках с крышками не более 10 сут при ненарушенной упаковке или невскрытом пенале.

Пробирки и другую лабораторную посуду до стерилизации следует хранить в чистых коробках или ящиках столов, выложенных чистой фильтровальной бумагой. Сверху подготовленную посуду также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и случайной грязи.

Вымытые предметные стекла вытирают чистой салфеткой и помещают в склянку с притертой пробкой с 96 %-ным спиртом или со смесью Никифорова (смесь этилового спирта и эфира в соотношении 1:1).

6.2 Подготовка и обработка емкостей для отбора проб при санитарно-вирусологическом анализе воды различного вида водопользования

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую стерильную посуду или стерильные емкости многократного применения с притертыми или завинчивающимися крышками, изготовленными из материалов, не влияющих на жизнедеятельность, не оказывающих инактивирующего действия на микроорганизмы и обеспечивающих неизменность состава пробы. Посуда (емкости) многократного использования должна быть изготовлена из материалов, выдерживающих стерилизацию паром и давлением (например, стеклянные бутыли объемом 1 л или пластиковые канистры объемом 10—20 л), а также обработку химическими и/или физическими методами.

Для отбора проб различного вида вод водопользования при санитарно-вирусологическом исследовании используются стерильные емкости:

- для анализа хозяйственно-бытовых сточных вод — стерильные емкости объемом 1 дм^3;
- для анализа воды поверхностных водоемов, подземных вод, также питьевой воды централизованного и нецентрализованного водоснабжения — стерильные емкости объемом 10—20 дм^3.

Стерилизацию лабораторной посуды сухим жаром проводят в суховоздушном шкафу одним из способов:

- при температуре (180 ± 3) °С — в течение 1 ч с момента достижения указанной температуры;
- при температуре (160 ± 5) °С — в течение 2,5 ч с момента достижения указанной температуры.

Материалы и лабораторную посуду (емкости), разрушающиеся при температуре от 160 °С до 180 °С (резина и т. п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре (121 ± 3) °С в течение 20 мин. После окончания анализа использованную лабораторную посуду (емкости) с содержимым обеззараживают автоклавированием при температуре (126 ± 2) °С и давлении 0,15 МПа в течение 60 мин с момента достижения указанной температуры; при росте споровой микрофлоры — при температуре (132 ± 2) °С и давлении 0,2 МПа в течение 90 мин с момента достижения указанной температуры.

При автоклавировании завинчивающиеся крышки не закручивают до конца, чтобы обеспечить замещение воздуха в бутыли паром во время повышения температуры. После стерилизации бутыли плотно закрывают завинчивающимися крышками.

После высушивания вирусологическую посуду многократного применения укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации (например, пакеты из крафт-бумаги самоклеящиеся для паровой, воздушной, пароформальдегидной, этиленоксидной и радиационной стерилизации).

После окончания стерилизации лабораторная посуда маркируется с указанием даты стерилизации.

Срок хранения стерильной лабораторной посуды, укупоренной в бумагу или металлические пеналы, составляет не более 30 дней.

6.3 Обработка силиконовых пробок

Новые пробки кипятят в течение 30 мин в 2 %-ном растворе бикарбоната натрия, многократно промывают горячей проточной водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят 30 мин в дистиллированной воде, промывают и высушивают.

Пробки, бывшие в употреблении, после кипячения в 2 %-ном растворе бикарбоната натрия ополаскивают проточной водопроводной водой, кипятят 30 мин в дистиллированной воде, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают.

Резиновые пробки для флаконов заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют автоклавированием по 6.1.

6.4 Порядок проведения контроля обсемененности флаконов, предназначенных для отбора проб

Контролю подвергаются все виды флаконов, используемые для отбора проб: стеклянные многоразового использования после стерилизации и пластиковые одноразового использования, поступающие стерильными от производителя.

Анализ проводят в боксе для разливки сред или в посевных комнатах (боксах) для посева питьевой воды.

Непосредственно перед исследованием проводят дезинфекционную обработку помещения (мытье бокса). После дезобработки включают дополнительно бактерицидные лампы в соответствии с 5.3.

Спецодежду для проведения анализа (халат, шапочку, четырехслойную марлевую маску) стерилизуют. Режим стерилизации спецодежды: автоклавирование при температуре (120 ± 2) °С в течение 45 мин, (126 ± 1) °С в течение 30 мин или при температуре (132 ± 2) °С в течение 20 мин.

Перед входом в бокс сотрудник, проводящий испытания, тщательно моет руки теплой водой с мылом и щеткой, вытирает стерильно полотенцем, одевается в стерильный халат, шапочку, маску, надевает перчатки, обрабатывает их 70 %-ным этиловым спиртом.

При наличии ламинарного укрытия исследование выполняют в спецодежде с использованием стерильных перчаток.

Во время испытаний проводят контроль воздуха на обсемененность в соответствии с процедурой, описанной в разделе 7. Результаты контроля заносят в протокол испытания.

6.4.1 Контроль обсемененности стеклянных флаконов для отбора проб при санитарно-бактериологическом анализе воды различного вида водопользования

Проводится контроль на общую обсемененность, контроль на наличие спор сульфитредуцирующих клостридий (кроме флаконов для отбора проб сточных вод).

При проведении контроля режимов суховоздушной стерилизации в полном объеме (биологический, термический, химический) с рекомендуемой периодичностью, контроль обсемененности стеклянных флаконов для отбора проб проводят не реже 1 раз в квартал.

Для каждого вида анализа отбирают флаконы в количестве 1 %, но не менее 3 от общего количества партии стерилизованной посуды. Партией флаконов считают все флаконы, прошедшие стерилизацию за один цикл работы одного стерилизатора.

В случае получения результата, свидетельствующего о нестерильности хотя бы одного флакона, все партии флаконов, прошедшие обработку в данном стерилизаторе, бракуют. Забракованные партии флаконов подлежат повторной стерилизации. Выясняют возможные причины нарушения стерильности. Проводят комплексную проверку стерилизатора с одновременным использованием химического, термического (в 5 точках) и биологического контроля согласно 10.3.

Подготовительный этап

Для контроля используют:

- жидкую полноценную неселективную среду (питательный бульон, ГРМ-бульон и др.), проверенной ранее серии (раздел 11);
- плотную полноценную неселективную среду (питательный агар, ГРМ-агар и др.), проверенной ранее серии (раздел 11);
- железосульфитный агар, приготовленный согласно инструкции производителя отечественного или зарубежного производства, предназначенный для определения сульфитредуцирующих клостридий в воде;
- стерильные мембранные фильтры (нитрат- или ацетат-целлюлозные) для микробиологических целей с диаметром пор 0,45 мкм, проверенной ранее партии;
- стерильные чашки Петри диаметром 90 мм;
- стерильную водопроводную воду;
- спирт-ректификат 96 %-ный для фламбирования;
- спирт-ректификат 70 %-ный для дезинфекции.

Питательный бульон предварительно проверяют на стерильность. Для этого 2 пробирки от приготовленной партии среды инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч — учитывают наличие (отсутствие) пророста среды. При наличии пророста партию бульона выбраковывают. Контроль стерильности питательного агара и железосульфитного агара проводят в процессе исследования путем постановки отрицательного контроля.

Контроль на общую обсемененность проводят внося в исследуемые флаконы питательный бульон в количестве 20 % от объема флакона (например, во флакон 500 см^3 вносят 100 см^3 питательного бульона). Флаконы закрывают стерильными резиновыми силиконовыми пробками и путем трехкратного покачивания или встряхивания обмывают всю внутреннюю поверхность флакона, включая пробку. Инкубацию посевов проводят при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч. При помутнении бульона во флаконе результат учитывают как «нестерильно». При сохранении прозрачности питательного бульона из каждого флакона отбирают по 1 см^3 и вносят в 2 стерильные чашки Петри, заливают питательным агаром при аккуратном покачивании и еще одну пустую стерильную чашку Петри с целью контроля среды заливают питательным агаром. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч. Наличие бактериального роста при условии отсутствия роста микроорганизмов в отрицательном контроле свидетельствует о нестерильности флакона. Результаты заносятся в протокол исследования.

Для контроля на наличие спор сульфитредуцирующих клостридий в исследуемые флаконы вносят 20 % от объема емкости стерильную водопроводную воду (например, во флакон 500 см^3 вносят 100 см^3 воды). Флаконы закрывают стерильными резиновыми пробками и путем трехкратного покачивания или встряхивания обмывают всю внутреннюю поверхность флакона, включая пробку. Фильтровальную установку готовят по 5.11 и используют фильтрующие материалы по 5.12. В качестве отрицательного контроля проводят фильтрацию 100 см^3 стерильной водопроводной воды и затем через другой мембранный фильтр без дополнительного обжига установки фильтруют весь объем смыва с флакона. Стерильным пинцетом берут фильтр за два противоположных края и, согнув в виде трубочки, помещают в пробирку с горячим агаром, при этом сторона фильтра с осевшими бактериями должна быть обращена внутрь, а фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки. Сразу же после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охлаждают, помещая в емкость с холодной водой. Культивируют посевы при (44 ± 1) °С в течение 16—18 ч. При обнаружении черных колоний результат учитывают как «нестерильно».

6.5 Дистиллированная вода, применяемая в микробиологических лабораториях, и периодичность ее контроля должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 58144.

Хранить дистиллированную воду следует в стеклянных или пластиковых бутылях, желательно с нижним сливом, закрытых крышками или пробками.

7 Санитарно-микробиологический контроль воздуха

7.1 Санитарно-микробиологический контроль воздуха в микробиологической и паразитологической лабораториях

7.1.1 Отбор проб

Санитарно-микробиологический контроль воздуха в микробиологической лаборатории.

Лабораторные исследования воздуха в помещениях на общее микробное число (ОМЧ) проводят ежедневно с целью получения оперативной информации о санитарном состоянии воздушной среды. Контроль воздуха осуществляют аспирационным или седиментационным методами.

При получении неудовлетворительных результатов контроля исследования воздуха в помещениях лабораторий, проводят исследование качественного и количественного состава микрофлоры, с которой работает лаборатория, в соответствии с проверяемыми объектами. После анализа полученных результатов проводят мероприятия, исключающие обсеменение воздуха и поверхностей, в том числе обработку поверхностей растворами дезинфицирующих средств, активных в отношении выявленной микрофлоры, и обработку воздуха и поверхностей ультрафиолетовым облучением.

7.1.2 Аспирационный метод

Отбор проб проводят в посевных комнатах лаборатории с помощью пробоотборных устройств воздуха для бактериологического анализа, разрешенных к применению в установленном порядке и поверяемых ежегодно аккредитованной организацией.

При переносе аппаратов и устройств для отбора проб воздуха из одного помещения в другое их поверхность обрабатывают раствором дезинфицирующего средства. Столик, внутренние стыки, крышку и прочие части прибора с внутренней и внешней стороны протирают 70 %-ным спиртом. Аспирационный метод не применяется для контроля воздуха укрытий с ламинарным потоком.

7.1.3 Седиментационный метод

Контроль данным методом проводят в боксах и ламинарных шкафах. Две открытые чашки Петри с питательным агаром расставляют в боксах и ламинарных шкафах на 15 мин. После экспозиции чашки закрывают, переворачивают и помещают в термостат. Инкубируют при температуре (36 ± 2) °С. Через (24 ± 2) ч проводят учет количества выросших колоний.

7.2 Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды

7.2.1 Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды проводят в помещениях лаборатории на санитарно-микробиологические показатели: общее количество микроорганизмов; количество колоний S. aureus; количество плесневых и дрожжевых грибов. Количество колоний, выросших на чашках, подсчитывают и проводят пересчет на 1 м^3 воздуха (КОЕ/м^3) по каждому показателю.

7.2.2 Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм^3 для определения общего количества микроорганизмов, для определения дрожжевых и плесневых грибов и S. aureus — 250 дм^3. Исследование воздуха седиментационным методом не допускается.

7.2.3 Для определения общего количества микроорганизмов в 1 м^3 воздуха забор проб проводят на питательный агар типа МПА, СПА, ГРМ-агар и др., приготовленные согласно инструкциям по применению. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 м^3 воздуха. При наличии роста на этих чашках колоний дрожжевых и плесневых грибов их подсчитывают и делают перерасчет на 1 м^3 воздуха. В протоколе количество дрожжевых и плесневых грибов указывают отдельно.

7.2.4 Схема бактериологического исследования на стафилококк

Первый день

Для определения наличия S. aureus забор проб проводят на желточно-солевые среды на основе сред: элективно-солевой агар, стафилококк-агар, маннитолагар или среда № 10 по ГФ XII, агар Байд-Паркер. Чашки с посевами инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение (48 ± 2) ч.

Второй-третий день

На вышеуказанных средах стафилококк растет в виде круглых, блестящих, маслянистых, выпуклых, пигментированных колоний. Следует учитывать, что стафилококки, выделенные от человека, дают положительную лецитовителазную реакцию в 60—70 % случаев. Снимают на скошенный агар для дальнейшего исследования не менее 2 колоний, подозрительных на стафилококк. Для исследования пересевают прежде всего колонии, дающие положительную лецитовителазную реакцию (образование радужного венчика). 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 отвивать не менее двух колоний различного вида. Пробирки с посевом помещают в термостат при (36 ± 2) °С на (24 ± 2) ч.

Четвертый день

После инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности в реакции плазмокоагуляции (РПК). Окраску по Граму проводят общепринятым методом. Если культура обладает только плазмокоагулирующей или только лецитовителазной активностью, то для окончательного ответа требуется учитывать другие признаки, позволяющие определить принадлежность штамма к виду S. aureus (ферментация маннита). При необходимости, после выделения чистой культуры, проводят определение чувствительности/устойчивости к антибиотикам, дезинфицирующим средствам, бактериофагам.

Пятый день

Учет результатов дополнительных тестов. Окончательная выдача ответа.

Исследования и учет результатов проводят по действующим нормативным документам. Полученные результаты должны регистрироваться в утвержденных по форме журналах (формулярах). В случаях превышения верхних лимитов бактериальной нагрузки в контролируемых помещениях, работы приостанавливаются. Проводят внеплановую генеральную уборку помещения с обработкой всех поверхностей дезинфицирующими средствами и обеззараживанием воздуха ультрафиолетовым облучением. Отбор повторяют после окончания проведенных мероприятий. Результаты регистрируются.

7.2.5 Для определения дрожжевых и плесневых грибов в воздухе используют отбор проб воздуха на среду Сабуро. Чашки с посевами термостатируют при температуре (24 ± 1) °С в течение 5 сут дном вверх.

Через 3 сут термостатирования проводят предварительный учет типичных колоний или появления характерных признаков роста на жидких питательных средах.

Если в посевах на агаризованных средах присутствуют мукоровые, очень быстро растущие грибы, то снятие предварительных результатов необходимо проводить очень осторожно, не допуская того, чтобы споры этих грибов осыпались и дали рост вторичных колоний. Через 5 сут проводят окончательный учет результатов 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 дрожжей в жидкой среде сопровождается появлением мути, запаха брожения и газа.

Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и/или от 5 до 50 колоний плесневых грибов.

При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов проводят микроскопические исследования. Для этого из отдельных колоний или из посевов на жидкую среду готовят препараты методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды. Затем в эту каплю прокаленной иглой вносится часть колонии или петлей наносят каплю культуральной жидкости. Полученная суспензия покрывается покровным стеклом.

Если при исследовании на питательных средах обнаружен рост дрожжей и плесневых грибов и их присутствие подтверждено микроскопированием, то данные фиксируют в журнале (формуляре) и проводят мероприятия, исключающие обсеменение воздуха и поверхностей плесневыми грибами. Затем проводят повторный отбор воздуха.

8 Санитарно-паразитологический контроль воздуха в паразитологической лаборатории

8.1 При получении неудовлетворительных результатов проб при осуществлении контроля проверяемых объектов каждая лаборатория самостоятельно определяет номенклатуру паразитологических показателей для контроля воздуха. Исследования обсемененности воздушной среды на яйца гельминтов и цисты простейших проводят в помещениях в зависимости от их функционального назначения, в соответствии с планом производственного контроля в паразитологических лабораториях, в которых возникает необходимость контроля воздушной среды по паразитологическим показателям.

8.2 Для сбора воздуха и пыли в лабораторных помещениях используют камеру, представляющую собой металлический цилиндр длиной 110—120 мм с внутренним диаметром 27 мм (по ширине стандартного предметного стекла). В стенке цилиндра имеется всасывающее отверстие размером 2 × 25 мм. Внутри цилиндра укреплены 2 стержня, фиксирующие предметное стекло в диаметральной плоскости и продольном направлении. С одного конца цилиндр закрывают съемной крышкой, а открытым концом присоединяют к патрубку пылесоса или другого всасывающего устройства (аспиратор, воздуходувка и т. п.).

На одну сторону чистого предметного стекла наносят тонкий слой 50 % раствора глицерина в виде полоски шириной 1,5—2,0 см и длиной 4—5 см. Стекло вставляют в камеру так, чтобы смазанная глицерином поверхность была обращена к всасывающему отверстию камеры. Камеру закрывают крышкой. Затем включают пылесос или другое всасывающее устройство и производят отбор пыли. При отборе проб воздуха всасывающее отверстие камеры должно быть обращено к исследуемой поверхности на расстоянии 2—3 мм. Перемещать всасывающее устройство во время работы над поверхностью следует равномерно. На одну пробу собирают воздух и пыль с площади не менее 0,25 $м^2$ в течение 20 сек, воздуха — 60 сек. После отбора пробы пылесос или другое всасывающее устройство выключают, открывают камеру и извлекают предметное стекло. На смазанной стороне стекла будет отчетливо виден пылевой след, представляющий собой готовый препарат, который микроскопируют (при увеличении в 56—80 раз).

8.3 Если препарат получился плотным, его просветляют 1—2 каплями воды или 50 % раствора глицерина. Под микроскопом среди пылевых частиц хорошо видны яйца гельминтов. Микроскопирование препаратов может производиться на обследуемом объекте сразу после отбора проб. Сбор проб пыли и воздуха непосредственно на предметное стекло, покрытое клейкой смазкой, исключает использование фильтров, центрифугирование, приготовление мазков и другие действия, во время которых могут быть потери яиц гельминтов или нарушение их целостности. Кроме того, использование клейких

стекол ускоряет время отбора проб и позволяет сразу составить план мероприятий по предупреждению загрязнения и дегельминтизации внешней среды, если такие загрязнения будут выявлены.

9 Методы исследования микробной и паразитарной обсемененности поверхностей

9.1 Для контроля микробной контаминации рабочих поверхностей используется метод смывов.

9.1.1 Смывы берут перед работой не реже 1 раза в месяц на стафилококк и микроорганизмы, с которыми работает данная лаборатория. В лабораториях, проводящих паразитологические исследования, дополнительно берут смывы на наличие яиц гельминтов, цист и ооцист патогенных простейших и т. д. Пробы отбирают с поверхности рабочих столов, ручек ящиков на каждом рабочем месте, ручек и полок холодильников, термостатов, наружных деталей приборов, со стен бокса, с дверных ручек и т. д., определяя потенциально критические точки. Методы санитарно-паразитологического исследования смывов с поверхностей приведены в приложении Б.

9.1.2 Для контроля используют пробирки с 0,1 %-ной пептонной водой, допускается стерильный физиологический раствор 0,85 % или другая разрешенная транспортная среда с вмонтированными стерильными палочками с ватными тампонами на конце. Возможно использование стерильных зонд-тампонов (свабов, тупферов и т. д.) промышленного производства.

9.1.3 Тампоны смачиваются непосредственно перед взятием смыва. Затем смоченным тампоном протирают исследуемую поверхность. При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят с площади не менее 100 $см^2$.

9.1.4 При применении дезинфицирующего агента используется нейтрализатор — стерильный раствор, химический состав которого зависит от действующих веществ дезинфицирующих средств:

- для галоидоактивных (хлор-, бром- и йодактивные) и кислородактивных (перекись водорода, ее комплексы солями, надуксусная кислота, озон) — 0,1—1%-е растворы тиосульфата натрия;
- для четвертичных аммониевых солей (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид и др.), аминов производных гуанидина (полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат и др.) — универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3 %), сапонин (0,3—3 %), гистидин (0,1 %), цистеин (0,1 %);
- для альдегидов (глутаровый альдегид, глиоксаль, формальдегид, ортофалевый альдегид) — 1%-ный раствор пиросульфита (метабисульфита) натрия или указанный выше универсальный нейтрализатор;
- для кислот — щелочи в эквивалентном количестве;
- для щелочей — кислоты в эквивалентном количестве;
- для спиртов — вода;
- для композиционных средств — универсальный нейтрализатор;
- в случае если в состав дезсредства входят окислители, в нейтрализатор добавляют тиосульфат натрия (0,1—1 %).

Пробы с отобранными смывами с поверхностей помещают в термостат и термостатируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч. Проросшие чашки не используют. Через сутки тампоном из пробирки со смывом пробы проводят несколько раз по поверхности питательной среды на двух параллельных чашках Петри, затем чашки Петри помещают в термостат для инкубации и проводят исследования.

9.2 Методика исследования смывов на бактериальную обсемененность поверхностей бактериями группы кишечной палочки (БГКП)

9.2.1 В пробирку с 5 $см^3$ среды Кесслер или Кода переносят 0,2—0,3 $см^3$ смывной жидкости. Посевы инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ± 2 ч. При использовании среды Кесслер высев со всех пробирок проводят на сектора со средой Эндо, а при использовании среды Кода высев на Эндо только с пробирок с изменившимся цветом среды. Посевы инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ± 2 ч. Выросшие колонии окрашивают по Граму или ставят тест Грегерсена, определяют отношение к оксидазе. Грамотрицательные, оксидазотрицательные культуры (проводят в соответствии с ГОСТ 31955.1) отсевают на глюкозо-пептонную среду с поплавком (ватой) или полужидкий агар Гисса с глюкозой. Инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ± 2 ч. Учет проводят по ферментации глюкозы до кислоты и газа, в результате записывают — «БГКП обнаружены».

9.3 Методика исследования смывов для обнаружения стафилококков

9.3.1 Объем 0,2—0,3 $см^3$ смывной жидкости засевают в пробирку с 5,0 $см^3$ 6,5 %-ного солевого бульона. Инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ± 2 ч. Из каждой пробирки делают высев на сектора чашки Петри с одной из сред, разрешенных к применению в установленном порядке для выращивания стафилококка (ЖСА, агар Байд-Паркер и другие). Инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение 48 ± 2 ч.

9.3.2 У выросших микроорганизмов определяют отношение к окраске по Граму, способность коагулировать плазму крови кроликов, образовывать каталазу, ацетон, ферментировать мальтозу в аэробных условиях. Вместо мальтозы можно использовать маннит.

9.3.3 Если в посеве обнаружены характерные колонии микроорганизмов, являющиеся грамположительными кокками, обладающими лецитиновой и плазмокоагулирующей активностью, образующими каталазу, ферментирующими мальтозу (или маннит) в аэробных условиях, выдается ответ: «Staphylococcus aureus обнаружен». Если из вышеперечисленных признаков отсутствует лецитиназная или плазмокоагулирующая способность, в ответе следует указать: «Обнаружен коагулазоположительный стафилококк, не обладающий лецитиназной активностью» или «Обнаружен лецитиназоположительный стафилококк, не обладающий плазмокоагулирующей активностью».

9.4 Методика исследования смывов для обнаружения синегнойной палочки

Объем 0,2—0,3 $см^3$ смывной жидкости засевают в пробирку с 5,0 $см^3$ с накопительной средой для синегнойной палочки и стафилококков № 9, средой Бонде и другими разрешенными к применению в установленном порядке средами для выращивания синегнойной палочки. Инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ± 2 ч. Высев на сектора одной из сред, разрешенных к применению в установленном порядке для выращивания синегнойной палочки, инкубируют при (36 ± 2) °С 24 ± 2 ч:

- на среде № 9 — обнаруживается пигмент синегнойной палочки пиоцианин;
- на среде «Блеск» — колонии сплошь покрыты золотистым налетом или имеют золотистые вкрапления, максимально проявляется пигмент через 42 ± 2 ч;
- на агаре с триклозаном бактерии вида Pseudomonas aeruginosa образуют колонии синие, сине-зеленые, желто-зеленые или зеленые;
- на агаре с цетримидом бактерии вида Pseudomonas aeruginosa образуют колонии голубого, сине-зеленого, желто-зеленого цвета или могут быть непигментированными.

Для последующей идентификации подозрительные колонии пересевают на скошенный агар.

9.5 Методика исследования смывов для обнаружения плесневых и дрожжеподобных грибов

Исследования и учет результатов проводят по 7.2.5.

9.6 Методы исследования паразитарного загрязнения поверхностей

9.6.1 Определение загрязнения возбудителями паразитарных болезней лабораторных поверхностей (стены, столы, поверхности микроскопа, лабораторное оборудование, ручки кранов, рабочие поверхности вытяжных шкафов, халатов, спецодежды, рук персонала и т. д.) проводится не реже 1 раза в месяц, отбирается не менее 10 проб смывов с поверхностей на 1 помещение, в котором проводятся паразитологические исследования в соответствии приложением Б. При взятии проб необходимо соблюдать определенную очередность. Например, пробы вначале берут в комнатах с рабочих поверхностей, оборудования, столов, рук персонала, затем с кранов раковин, дверных ручек и в санузле лаборатории.

9.6.2 Для отбора смывов применяют кисточки из плотной щетины (типа беличьих), смоченные в 1 %-ном растворе едкого натра, или в 10 %-ном растворе глицерина, или 1 %-ном растворе стирального порошка. В центрифужные пробирки наливают до половины объема 10 %-ный раствор глицерина.

9.6.3 Для каждой группы лабораторных предметов или поверхностей берут отдельную промаркированную центрифужную пробирку и кисточку, которые нумеруются (номер кисточки и пробирки должны совпадать). В одну пробу, т. е. в пробирку, рекомендуется собирать смывы с нескольких однородных предметов.

9.6.4 Смывы с рук персонала берут у каждого отдельно, чтобы при обнаружении яиц гельминтов или/и цист/ооцист кишечных простейших можно было знать, какой именно сотрудник нарушает правила гигиены.

Для снятия яиц гельминтов с рук рекомендуется мыть их раствором питьевой соды или 1%-ным раствором едкого натра; смывные воды центрифугируют, осадок можно также профильтровать в аппарате Гольдмана и затем исследовать фильтры.

При взятии смывов с поверхностей кисточкой, смоченной в растворе, многократно и с нажимом проводят по поверхности однородных предметов обследуемого объекта (поверхности микроскопов, столы рабочие, подоконники, ручки дверей и др.). Причем кисточку в процессе отбора часто и тщательно ополаскивают в пробирке и вновь делают смывы с поверхности предметов. Площадь исследуемой поверхности для одной пробы смывов составляет не менее 0,25 м^2 (0,5 × 0,5 м). После отбора проб пробирки с вложенными в них кисточками в штативах доставляются на исследование.

9.6.5 Исследование смывов на яйца гельминтов. Метод центрифугирования

Ход исследования

Кисточки со смывами ополаскивают в жидкости пробирки. Центрифугируют полученные пробы в этих же пробирках, надосадочную жидкость сливают. Осадок помещают на предметное стекло и микроскопируют. Плотный осадок делят на несколько предметных стекол.

9.6.5.1 Исследование смывов на яйца гельминтов

Ход исследования

В пробирку со смывом добавляют 5—6 см^3 флотационного раствора, в котором тщательно и многократно промывают кисточку в течение 3—5 мин вертикальными и круговыми движениями, после чего кисточку сразу удаляют из пробирки.

В пробирку доливают флотационный раствор до образования выпуклого мениска, накрывают ее обезжиренным покровным стеклом до полного соприкосновения с поверхностной пленкой раствора. Время экспозиции 12—15 мин. При использовании флотационного раствора хлорида натрия — 20—25 мин. Затем покровное стекло снимают пинцетом и полученную висячую каплю на покровном стекле аккуратно переносят на предметное стекло в каплю 50%-ного раствора глицерина. Полученный препарат микроскопируют при 80—150-кратном увеличении.

Готовить пробы к исследованию одновременно следует партиями не более 5—6 пробирок, так как при большом количестве пробирок увеличивается время экспозиции, и яйца, поднявшиеся в поверхностную пленку, покрываются кристаллами соли, что затрудняет их обнаружение.

Методы исследования смывов на цисты/ооцисты простейших представлены в приложении Б.

9.7 Санитарно-вирусологический методы исследования поверхностей в вирусологических лабораториях

Взятие смывов с объектов окружающей среды на предприятиях, тары, упаковки пищевых продуктов проводят в соответствии с методическими указаниями, используя стерильные зонды (коттоны). Зонд осторожно смачивают в фосфатно-солевом буфере (PBS), налитом в микроцентрифужные пробирки по (490 ± 5) мкл, отжимают о край пробирки для удаления излишков фосфатно-солевого буфера (PBS) и отбирают смыв с обследуемой поверхности площадью 100 см^2, используя один или несколько трафаретов, слегка нажимая на зонд для лучшего сбора вирусных частиц. Сразу после забора смыва зонд помещают обратно в пробирку, интенсивно вращают в пробирке и вновь отжимают об ее край для максимального удаления раствора из зонда. Данная процедура повторяется трехкратно.

Смывы в микроцентрифужных пробирках в фосфатно-солевом буфере (PBS) готовы для экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК) (выделение из 200 мкл образца). Смывы хранению не подлежат и сразу направляются на исследование с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот на наличие энтеровирусов человека, вирусов гепатита А, ротавирусов, норовирусов.

10 Порядок проведения контроля качества осуществления стерилизации и обеззараживания

Плановый контроль работы всех стерилизаторов в объектах надзора проводят в порядке государственного санитарного надзора не реже 2 раз в год. Самоконтроль работы стерилизатора проводят при каждой загрузке аппарата.

Критическими параметрами, существенными для достижения надежной стерилизации и требующими контроля, являются:

- для паровой стерилизации — температура стерилизации, время стерилизационной выдержки и наличие насыщенного водяного пара;

- для воздушной стерилизации — температура стерилизации и время стерилизационной выдержки.

Контроль температурного параметра режимов работы паровых стерилизаторов осуществляют с использованием термометра ртутного стеклянного максимального с диапазоном измерения от 0 до 150 °С (ТП-7). Погрешность измерения не должна превышать ± 1 °С.

Упакованные термометры нумеруют и размещают в контрольные точки 1 и 2 камеры паровых стерилизаторов в соответствии с 10.1.

По окончании цикла стерилизации регистрируют показания термометров и сопоставляют их между собой, а также с номинальной температурой стерилизации, и фиксируют показания в журнале.

Давление в стерилизационной камере парового стерилизатора измеряют при помощи мановакуумметра. Класс точности мановакуумметра должен быть не ниже 2,5. Предел измерения от 0,1 до 0,5 МПа (от 1 до 5 кгс/см^2).

Ежедневно перед началом рабочей смены проводят визуальный контроль состояния уплотнителей камеры стерилизатора. При работе стерилизатора осуществляют контроль за отсутствием выпуска пара из-под уплотнителя и установку давления на манометре парового стерилизатора.

Не допускается использование одного стерилизатора для режимов стерилизации лабораторной посуды, одежды и питательных сред и обеззараживания патогенного материала.

10.1 Химический тестовый контроль режимов паровой стерилизации

Химический контроль проводят каждый цикл. Для контроля используют бумажные индикаторы стерилизации 4—5 класса (НПФ «Винар» или аналог) в соответствии с ГОСТ Р ИСО 15882 или запаянную ампулу или трубку, заполненную смесью химического соединения с органическим красителем или только химическим соединением (веществом), изменяющим цвет при достижении определенной для него температуры, позволяющие обнаружить несоблюдение условий стерилизации, обусловленное технической неисправностью стерилизаторов, нарушением правил их загрузки и упаковывания изделий, ошибкой в установке параметров режимов или их сбоем.

Методика контроля паровой стерилизации

В контрольных точках рабочей камеры укладывают индикаторные полоски или ампулы, которые прикрепляются снаружи стерилизационной упаковки или на бирке стерилизационной коробки во всех контрольных точках (см. таблицу 1) или внутри стерилизуемых изделий.

Таблица 1 — Число контрольных точек в зависимости от емкости камеры

Емкость камеры парового стерилизатора (дм^3)	Число контрольных точек в стерилизационной камере
100	5
100—750	15
Св. 750	20

Для паровых стерилизаторов с камерой емкостью до 100 дм^3 контрольные точки для размещения индикаторных полосок или ампул располагают:

- в горизонтальном паровом стерилизаторе точка 1 должна находиться у загрузочной двери, точка 2 — у противоположной стенки, точки 3—5 должны быть равномерно распределены по длине;
- в вертикальном паровом стерилизаторе точка 1 должна находиться в верхней части камеры, точка 2 — в нижней части камеры, точки 3—5 должны быть равномерно распределены по высоте камеры.

В точках 1 и 2 индикаторные полоски или ампулы располагают вне стерилизуемых изделий. В остальных точках индикаторные полоски или ампулы располагают в центре и прикрепляют к изделиям, подготовленным для стерилизации.

Для паровых стерилизаторов с камерой емкостью свыше 100 дм^3 точки 1 и 2 располагают, как указано выше, а остальные — равномерно распределяют по длине (высоте) горизонтального (вертикального) парового стерилизатора.

Методика контроля суховоздушной стерилизации

В контрольных точках рабочей камеры укладывают герметично запаянные ампулы-флаконы с химическим тестовым веществом или индикаторные полоски (см. таблицу 2), которые прикрепляют к упаковкам или стерилизуемым изделиям.

Таблица 2 — Число контрольных точек в зависимости от емкости камеры

Емкость камеры воздушного стерилизатора ($дм^3$)	Число контрольных точек в стерилизационной камере
До 80	5
Св. 80 однокамерные	15
Св. 80 двухкамерные	30

В случае 5 точек — точка 1 располагается в центре камеры, а точки 2, 3, 4 и 5 располагаются в нижней части камеры по углам. Точки 2 и 5 находятся перед загрузочной дверью справа и слева (соответственно), а точки 3 и 4 в глубине камеры у задней стенки также справа и слева.

В случае 15 точек — точки 1, 2 и 3 располагаются в центре камеры на трех уровнях (полках) сверху вниз соответственно, а точки 4—15 по углам также на трех уровнях (точки 4—7 — низ; точки 8—11 — середина; точки 12—15 — верх). Угловые точки нумеруются против часовой стрелки, начиная с правого ближнего угла.

В случае 30 точек — расположение как для 15 точек повторяется для каждой камеры.

Каждая контрольная точка должна быть расположена на расстоянии не ближе 5 см от стенок камеры.

Учет результатов

По окончании цикла стерилизации цвет индикаторной метки индикаторов сравнивают с цветом эталона. При соблюдении условий паровой и суховоздушной стерилизации в точке размещения индикатора индикаторная метка изменяет свой цвет на темно-фиолетовый, соответствующий цвету эталона (конечный цвет) или темнее его. Если индикаторная метка полностью или частично сохранила красно-оранжевый цвет или в пробирке остался нерасплавленный химический тест в какой-либо точке, то указывают на неэффективную стерилизацию. При обнаружении неудовлетворительной работы стерилизатора партию стерилизуемых объектов считают непростерилизованной.

«Наружные» индикаторы подлежат осмотру непосредственно после завершения цикла стерилизации с последующим подклеиванием в журнал контроля работы стерилизаторов.

«Внутренние» индикаторы подлежат осмотру после вскрытия стерилизационной упаковки/стерилизационной коробки перед применением стерилизованных изделий. Эти индикаторы подклеивают в журнал контроля после использования стерильных упаковок.

10.2 Термический контроль

Термический контроль проводят 2 раза в месяц. Для контроля используют поверенный максимальный термометр с ценой деления не более 1 °С и диапазоном измерений, превышающим контролируемую температуру. Термометр размещают в середине стерилизационной камеры. После окончания цикла стерилизации и остывания снимают показания термометра. Для определения истинного значения максимальной температуры цикла стерилизации к снятому с термометра показанию прибавляют соответствующую поправку, указанную в паспорте на данный термометр.

Результаты заносят в журнал по регистрации режимов стерилизации и заверяют подписями исполнителя.

10.3 Биологический контроль

Биологический контроль осуществляется 2 раза в год. При выполнении биологического контроля используют биотесты, предназначенные для конкретного вида паровой или суховоздушной стерилизации, разрешенные к применению на территории РФ. Бактериологический метод контроля предназначен для контроля эффективности работы стерилизаторов на основании выявления гибели спор тест-культур.

Процедуру контроля осуществляют в соответствии с паспортом биотеста. Пронумерованные пакеты с биотестами размещают в контрольных точках стерилизатора. Количество контрольных точек и правила размещения тестов указаны в 10.1. После завершения процесса стерилизации в пробирки с биотестами асептически вносят 0,5 $см^3$ прилагаемой к набору питательной среды, начиная со стерильной пробирки для контроля питательной среды и заканчивая контрольным тестом, не подвергавшимся стерилизации (контроль культуры). Далее осуществляют инкубацию пробирок согласно паспорту на набор.

После термостатирования проводят учет изменения цвета питательной среды. В отрицательном контроле (стерильная пробирка) цвет среды не должен измениться. В пробирке с контролем культуры цвет среды должен измениться на цвет, указанный в паспорте, что свидетельствует о наличии жизнеспособных спор.

Работа парового стерилизатора считается удовлетворительной, если цвет питательной среды во всех биотестах, подвергавшихся стерилизации, остался неизменным. Если цвет изменился хотя бы в одном тесте, стерилизация признается неэффективной.

Результаты заносят в журнал по регистрации режимов стерилизации и заверяют подписью исполнителя.

10.4 Обеззараживание отходов с применением СВЧ-установки

Отходы в микробиологических лабораториях, соответствующие классу опасности Б, собираются непосредственно на местах их образования в одноразовые полимерные термостойкие пакеты с красной или желтой маркировкой, которые предварительно помещают внутрь стандартных жестких, термостойких, герметично закрывающихся полимерных баков (контейнеров) многоразового использования (поставляются в комплекте с СВЧ-установкой). Герметично закрытые в баках (контейнерах) отходы доставляются к месту их обеззараживания в СВЧ-установке. Предварительной дезинфекции отходов не требуется.

Кроме СВЧ-установки для обеззараживания отходов применяются методы в соответствии с [1].

Порядок работы на местах сбора медицинских отходов:

- термостойкие пакеты с красной или желтой маркировкой расправляются и вкладываются внутрь стандартных термостойких контейнеров-баков;
- верхние кромки пакета отгибают наружу за края бака;
- готовится рабочий раствор сенсибилизатора: в отдельную емкость наливают 2 $дм^3$ воды и добавляют 1 столовую ложку концентрата сенсибилизатора;
- на дно пакета наливают 300—500 $см^3$ рабочего раствора сенсибилизатора;
- производят сбор инфицированных отходов и укладку их (без уплотнения) в приготовленный пакет (бак).

10.4.1 Контроль эффективности обеззараживания отходов осуществляется термохимическим и бактериологическим методами. Для контроля применяются в установке одноразовые индикаторы с липким слоем с нанесенными на них двумя цветными метками — индикаторной меткой и эталоном сравнения.

Пример — В качестве индикаторов может быть использован СанИС-3 132/90 (134/60) или аналоги.

Красно-оранжевый цвет индикаторной метки необратимо меняется в зависимости от соблюдения или несоблюдения требуемых условий дезинфекции.

Темно-фиолетовый эталон сравнения показывает конечный цвет индикаторной метки при соблюдении условий дезинфекции.

При соблюдении условий дезинфекции в точке размещения индикатора индикаторная метка изменяет свой цвет на темно-фиолетовый, соответствующий цвету эталона (конечный цвет) или темнее его.

Если индикаторная метка полностью или частично сохранила красно-оранжевый цвет, то условия дезинфекции не были соблюдены.

При получении неудовлетворительного результата контроля проверяют правильность установки параметров и соблюдение правил и норм загрузки в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Установку разрешается использовать после устранения причин неудовлетворительной работы и получения положительных результатов контроля. Использованные индикаторы подклеиваются в журнал контроля работы СВЧ-установки в выделенные для этого колонки.

Контроль обеззараживания отходов в установке с помощью термохимических индикаторов осуществляется при каждой закладке с дальнейшей регистрацией результатов в журнале (формуляре).

Бактериологический метод контроля работы установки осуществляется с помощью типовых биотестов. Биотесты размещают в контрольные точки среди обеззараживаемого материала (3—5 точек на разных уровнях).

После окончания процесса обеззараживания биотесты высевают на питательные среды.

Контроль с помощью биотестов проводится не реже 2 раз в год, и результаты также регистрируются в установленном порядке.

11 Порядок проведения контроля за питательными средами

Контроль качества питательных сред должен осуществляться на всех этапах технологического процесса, начиная от момента закупки среды до непосредственного использования в анализе и включать следующие этапы:

- проверку документации и визуальный контроль питательных сред при их получении;
- контроль условий и сроков хранения питательных сред;
- контроль питательных сред на этапе приготовления;
- контроль биологических свойств питательных сред;
- контроль на этапе использования питательных сред.

Применение питательных сред без подтверждения их качества не допускается. Результаты выполнения процедур контроля качества должны быть документально зафиксированы.

11.1 Проверка документации и визуальный контроль питательных сред

Контроль осуществляют при каждом поступлении в лабораторию новых сред.

Обязательным условием поставки питательных сред является наличие следующих сопроводительных документов:

- регистрационного удостоверения;
- паспорта отдела контроля организации-изготовителя на реализуемую серию препарата;
- инструкций по применению на русском языке;
- этикеток на русском языке.

Среды импортного производства должны иметь сертификаты качества серии ИСО 9000.

При получении питательных сред необходимо проверить целостность упаковки (оценивается визуально) и наличие сопроводительной документации, которая должна содержать следующую информацию:

- название среды и ее назначение;
- название предприятия-изготовителя;
- номер серии;
- номер протокола контрольных испытаний;
- дату изготовления;
- срок годности;
- состав среды;
- условия хранения;
- рецептуру приготовления;
- описание внешнего вида и консистенции сухой и готовой среды;
- условия и длительность хранения готовой среды.

Обо всех обнаруженных отклонениях необходимо сообщить руководителю лаборатории.

11.2 Контроль условий и сроков хранения питательных сред

Данный этап контроля позволяет обеспечить правильность и постоянство условий хранения сред, а также своевременное пополнение их запаса.

Визуальный контроль питательных сред осуществляют 1 раз в неделю на отсутствие проростка, изменение цвета и прозрачности.

Сухие питательные среды и реактивы, если не указаны особые условия хранения, необходимо поместить в сухое, защищенное от света место, с температурой воздуха 10—25 °С.

Материалы, требующие пониженной температуры хранения, необходимо поместить в холодильник с соответствующей степенью охлаждения.

Особое внимание следует уделить сохранению герметичности вскрытых упаковок со средами, так как повышение влажности и комкование сухой питательной среды существенно ухудшает ее качество. Если питательная среда упакована в пакет из ламинированной бумаги и весь объем среды не используется за 1 раз, то после вскрытия пакета оставшуюся часть среды желательно перенести в чистую сухую емкость оранжевого стекла (или другого светозащитного инертного материала) с плотно закрывающейся крышкой.

Готовые питательные среды хранят при температуре 2—8 °С. Срок хранения готовой питательной среды определяется изготовителем.

Сухие питательные среды с истекшим сроком годности, но с не изменившимся цветом и консистенцией, подвергают количественным методам контроля питательных сред по биологическим показателям с целью принятия решения о продлении срока годности.

Все приготовленные среды следует промаркировать с указанием названия среды, а также даты приготовления и срока годности. Дату приготовления питательной среды заносят в журнал.

Параметры микроклимата в местах хранения питательных сред проверяют ежедневно и результаты проверки заносят в журнал (формуляр) и заверяют подписью исполнителя.

11.3 Контроль питательных сред на этапе приготовления

Для приготовления питательных сред и растворов, используемых в микробиологическом анализе, допускается применение химических веществ по степени чистоты не ниже ЧДА. Требования к качеству воды для приготовления питательных сред для микробиологических анализов изложены в ГОСТ Р 58144.

При условии, что приобретена продукция надлежащего качества, одним из основных факторов, определяющих качество и дальнейшую пригодность питательной среды, является правильность ее приготовления.

Приготовление сред должно осуществляться со строгим соблюдением рецептуры приготовления и условий стерилизации, определенных изготовителем.

Контроль питательных сред на этапе приготовления включает:

- оценку внешнего вида готовой среды;
- измерение pH готовой среды;
- определение стерильности (отсутствия контаминации) готовой среды;
- постановку качественного контроля биологических свойств среды (раздел 11).

Контроль питательных сред на этапе приготовления проводят при каждом приготовлении среды.

11.3.1 Оценка внешнего вида готовой среды (визуальный контроль)

Оценку внешнего вида питательной среды проводят визуально по ниже приведенным параметрам.

Цвет, прозрачность и консистенция сухой и приготовленной среды должны быть типичны для данного продукта и соответствовать описанию изготовителя. Несоответствие заявленным в паспорте параметрам среды свидетельствует о ее непригодности.

Некоторыми очевидными ошибками при приготовлении сред являются:

- потемнение среды вследствие перегревания и недостаточного перемешивания;
- неполное растворение порошкообразной среды;
- образование осадка.

В агаризованных средах осадок может образовываться вследствие продолжительной стерилизации, повторных плавлений твердого агара или длительного содержания расплавленного агара при высокой температуре. В этих случаях появление осадка свидетельствует о непригодности питательной среды.

Кроме того, агаризованные среды могут образовывать хлопьевидный осадок, если расплавленная среда остается в водяной бане при температуре от 43 до 45 °С более 30 мин, вследствие начинающегося процесса застывания агара. Такой хлопьевидный осадок агара можно рассеять путем повторного нагревания среды до 60 °С. Если осадок не рассеялся, это свидетельствует о непригодности питательной среды.

11.3.2 Измерение pH

Значение водородного показателя определяют с помощью pH-метра по 5.10. Возможно использование бумажной индикаторной системы с шагом измеряемого диапазона не более 0,3 единиц при промежуточных измерениях в ходе приготовления питательной среды.

В готовых жидких средах и гидролизатах определение pH проводят непосредственно в растворе.

В готовых плотных агаровых средах pH определяют после их охлаждения до 45—50 °С. При этом необходимо особо тщательно отмывать электрод после измерения pH в агаризованных средах теплой дистиллированной водой.

11.3.3 Определение стерильности

Определение стерильности (для стерилизуемых сред) и отсутствия контаминации (для нестерилизуемых сред) проводят путем инкубации чашки или пробирки с исследуемой средой в термостате, при температуре и в течение времени, определенных для этих сред методическими документами по исследованию воды.

По истечении срока инкубации на (в) исследуемых питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов. Результаты регистрируют в журнале.

11.4 Контроль биологических свойств питательных сред

Оценка биологических (ростовых) свойств питательных сред проводится по следующим показателям.

Чувствительность — максимальное разведение тестовой культуры, при котором на всех засеянных чашках (во всех пробирках) обнаруживается рост.

Скорость роста — минимальное время инкубации после посева культур, достаточное для визуального выявления роста (выражается в часах).

Дифференцирующие свойства — оцениваются по выраженности основных отличительных признаков, характеризующих рост тестовых штаммов на данной питательной среде.

Кроме того, для дифференциальных сред необходимо определять ингибирующее действие среды. Ингибирующее действие среды определяется как в отношении основного тестового микроорганизма, так и по отношению к сопутствующим микроорганизмам.

Оценка ингибирующих свойств не проводится для жидких и полужидких сред (например, для полужидких сред Гисса, лактозо-пептонной среды, глюкозопептонной среды).

Оценка ингибирующих свойств проводится по двум показателям:

- процент извлекаемости — процентное соотношение среднего значения количества колоний, выросших на исследуемой среде, к среднему значению количества колоний, выросших на контрольной среде;
- показатель ингибиции — степень подавляющего воздействия на постороннюю микрофлору, выражается минимальным разведением, при котором полностью отсутствует рост посторонней флоры.

Основным тестовым микроорганизмом для оценки биологических свойств среды, используемых для текущего санитарно-бактериологического контроля воды, является E. coli.

Дополнительно используются следующие тест-штаммы:

- для выявления дифференцирующих свойств среды — Salmonella typhimurium (на среде Эндо круглые, бледно-розовые колонии) или Shigella sonnei «S-form» (на среде Эндо круглые, прозрачные, бледно-розовые) в качестве вида, не ферментирующего лактозу; Enterococcus faecalis; Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas fluorescens; Staphylococcus aureus; Aspergillus brasiliensis; Candida albicans;
- при определении показателя ингибиции посторонней микрофлоры, например на среде Эндо — Staphylococcus aureus.

Контроль биологических свойств готовых питательных сред включает два этапа: качественный и количественный контроль, каждый из которых имеет свое целевое предназначение.

Задачей качественного контроля является выявление грубых нарушений технологии приготовления, приводящих к выраженному снижению ростовых и/или дифференцирующих свойств. Качественный контроль проводят после каждой варки среды.

Количественный контроль позволяет выявлять относительные изменения (ухудшение) ростовых свойств из-за ряда причин, возникающих на этапах транспортирования, хранения, приготовления, стерилизации, а также при изменении технологических требований в процессе производства питательных сред, в результате которых они оказываются менее эффективными.

Количественный контроль выполняется:

- при поступлении каждой новой партии среды;
- при необходимости решения вопроса о продлении срока годности среды либо возможности ее дальнейшего использования в случае выявления нарушений условий хранения.

Учитывая, что разные серии питательных сред одного производителя иногда имеют различие по качеству, контролю подлежит каждая серия среды поступившей партии.

Количественный контроль также может служить инструментом выбора более эффективной среды серии продукции, предлагаемой на современном рынке.

11.4.1 Качественный контроль

В процессе качественного контроля оценивают принципиальную способность основного тестового штамма расти на данной среде, а также наличие характерных дифференцирующих признаков для специфических сред.

Качественный контроль выполняется лабораторией после каждой варки питательной среды.

11.4.1.1 Методика исследования

Накануне исследования тестовую культуру готовят, как указано в 13.3.4.

Контроль выполняют путем посева тестового штамма в жидкие, полужидкие или на плотные питательные среды с помощью общепринятых методик. Для плотных сред метод посева должен обеспечивать получение изолированных колоний микроорганизмов (например, метода «штриха»). Пробирки и чашки с посевами инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

11.4.1.2 Оценка результатов качественного контроля

Среду считают пригодной, если по истечении срока инкубации тестовый штамм дает хорошо различаемый рост, со всеми типичными для него отличительными признаками, которые предполагается выявлять на данной среде.

Этими признаками могут быть: помутнение жидкой или полужидкой среды, изменение цвета, образование газа, отличительная форма, структура, окраска колоний, наличие и диаметр зоны изменения цвета и прозрачности среды вокруг колоний. Результаты качественного контроля заносят в журнал.

11.4.2 Количественный контроль

Выполнение количественного контроля должно осуществляться лабораторией, имеющей лицензию на работу с необходимыми патогенными микроорганизмами, аттестованной (аккредитованной) в этой области и располагающей персоналом соответствующей квалификации.

11.4.2.1 Подготовительный этап

11.4.2.1.1 Питательные среды

Для исследования следует использовать свежеприготовленные среды одной варки. Исследуемые и контрольные среды готовят согласно инструкции изготовителя.

Среды, предназначенные для прямого поверхностного посева, разливают в чашки Петри слоем не менее 2 мм и предварительно асептически подсушивают одним из следующих способов.

Перевернутые чашки Петри с открытыми крышками выдерживают в термостате или сушильном шкафу при температуре 25—50 °С до исчезновения капель влаги с поверхности агара. Не пересушивать.

Закрытые неперевернутые чашки Петри выдерживают в ламинарном боксе в течение ночи.

Во избежание загрязнения и когда слои среды высушивают не в ламинарном боксе, среду всегда высушивают таким образом, чтобы поверхность среды, инокуляция которой будет проводиться, была перевернута вниз.

В качестве неселективной среды при определении ингибирующих и дифференцирующих свойств контролируемой среды, используют мясопептонный агар, питательный агар, ГРМ-агар, триптон-соевый агар или их аналоги.

11.4.2.1.2 Разбавитель

Для исследования необходимо использовать стерильный физиологический раствор, содержащий 0,1 % (по массе) пептона. При невозможности приготовления данного разбавителя допускается использование стерильного физиологического раствора без пептона.

11.4.2.1.3 Подготовка инокулята

За 2 дня до исследования тестовую культуру микроорганизма пересевают со среды хранения на скошенный питательный агар согласно 13.3.4. На следующий день из полученной агаровой культуры с использованием стандарта мутности готовят суспензию тестового штамма в стерильном разбавителе с концентрацией 10^9 кл/см^3 и десятикратные серийные разведения (по 8-е разведение включительно), согласно разделу 12.

Для контроля разбавления из 6-го и 7-го разведений высевают по 0,1 см^3 (100 мкл) суспензии прямым поверхностным посевом на чашки с питательным агаром. Из каждого разведения делают по три таких посева. После высева пробирки с разведениями немедленно переносятся в холодильник. Чашки с посевами инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

В день исследования для каждой серии посевов подсчитывают среднее число колоний, выросшее на трех чашках. При правильно выполненном разведении среднее количество колоний, выросших при посеве 0,1 см^3 суспензии тестового микроорганизма из 6-го разведения, должно составлять около 100 КОЕ. Соотношение полученных средних значений при посеве из 6-го и 7-го разведений должно быть близко к 10:1.

В случае если концентрация микроорганизмов в разведениях значительно отклоняется от расчетной и/или не соблюдена кратность разведения, данный инокулят тестового штамма непригоден для дальнейшего использования. Подготовку инокулята необходимо повторить.

Для показателей, требующих определения количества внесенных микроорганизмов, рассчитывают посевную дозу. Посевная доза — объем конкретного разведения, содержащий необходимое для посева количество жизнеспособных клеток тестового микроорганизма. В контрольном посеве должно

вырастать не менее 25 колоний. Расчет дозы выполняют основываясь на ранее определенных концентрациях тестового микроорганизма в 6-м и 7-м разведениях, исходя из требований, что посев на одну чашку не должен превышать 50—100 микробных клеток. При правильно выполненном разведении посевная доза составляет 50—100 мкл суспензии из 6-го разведения.

После расчета посевной дозы определяют необходимое количество повторов посевов (не менее 5) исходя из расчета, что суммарное количество колоний на всех чашках на одной среде должно составлять не менее 200 КОЕ.

Приготовленные суспензии можно использовать, если они были охлаждены сразу же после приготовления и произведения контрольных высевов, и не хранились более 24 ч. Перед исследованием инокулят следует тщательно перемешивать, чтобы добиться однородности суспензии микроорганизмов.

11.4.2.2 Методики посевов

11.4.2.2.1 Посев в жидкую питательную среду

Данный метод посева используется при количественном определении показателей ростовых и дифференцирующих свойств жидких и полужидких питательных сред. Суспензию нужного разведения тестовой культуры тщательно перемешивают, чтобы добиться ее однородности. Посевную дозу суспензии асептически помещают при помощи пипетки в пробирку с исследуемой питательной средой и перемешивают. Инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

11.4.2.2.2 Посев прямым поверхностным методом

Суспензию нужного разведения тестовой культуры тщательно перемешивают, чтобы добиться ее однородности. Посевную дозу суспензии асептически помещают при помощи пипетки, на поверхность заранее подготовленной питательной среды (11.4.2.1.1). Стерильным шпателем культуру распределяют по поверхности питательного агара, чтобы добиться равномерного распределения инокулята. После впитывания инокулята чашки переворачивают и инкубируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

11.4.3 Определение показателей «чувствительности» и «скорости роста»

11.4.3.1 Методика исследования

При определении показателей чувствительности и скорости роста используют по 0,1 $см^3$ из 4, 5, 6, 7-го разведений для посева на плотные питательные среды и по 1,0 $см^3$ из 5, 6, 7 и 8-го разведений для посева в жидкие среды. Разведения готовят и контролируют, как указано в 11.4.2.1.3.

Посев каждой дозы инокулята выполняют не менее чем на 3 чашки или пробирки в соответствии с 11.4.2.1.3 Посевы инкубируют при (36 ± 2) °С в течение 24 ч. Визуальный учет скорости роста культуры в каждом взятом в опыт разведении микробной взвеси производят для плотных сред через 12 и 24, а для жидких — через 3, 6 и т. д. часов инкубации.

11.4.3.2 Оценка результата

Чувствительностью среды считается наибольшее разведение исходной суспензии тестового штамма с исходной концентрацией около 10^9 КОЕ/$см^3$, обеспечивающее формирование колоний на всех засеянных чашках или визуально видимый рост во всех пробирках с исследуемой средой.

Чувствительность среды должна соответствовать параметру, указанному изготовителем в паспорте данной среды. Если данный параметр изготовителем не указан, то чувствительность должна составлять не менее чем 0,1 $см^3$ суспензии из 6-го разведения для плотных и 1 $см^3$ суспензии из 7-го разведения для жидких питательных сред.

При отсутствии роста в одной пробирке или на одной чашке с посевом разведения, указанного в паспорте как чувствительность, опыт повторяется на удвоенном числе пробирок или чашек. Приемлемым считается наличие роста в 5-ти посевах оцениваемого разведения из 6-ти. Если при повторном исследовании чувствительность среды не соответствует паспортному значению, то ее бракуют.

Скорость роста контрольной культуры — минимальное время инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении обеспечен отчетливый видимый невооруженным глазом рост культуры во всех пробирках с жидкими питательными средами (помутнение, наличие пленки, изменение цвета среды) или формирование типичных, легко дифференцируемых колоний на чашках с плотной средой.

Скорость роста не должна превышать время инкубации, указанное в нормативных документах для исследований, в которых эта среда используется.

Результат заносят в протокол оценки питательной среды по биологическим показателям.

11.4.3.3 Оценка дифференцирующих свойств на примере среды Эндо и ее аналогов

Для оценки дифференцирующих свойств сред используют два тестовых штамма, отличающихся по основному дифференцируемому признаку ферментации лактозы E. coli (Lac+) и Shigella sonnei или Salmonella typhimurium (Lac-).

11.4.3.4 Подготовка инокулятов

Разведения тестовых штаммов готовят, как указано в 11.4.2.1.3. Посевная доза должна содержать 50—100 микробных клеток на чашку, рассчитанная по контрольному посеву.

11.4.3.5 Методика исследования

Из разведений тестовых штаммов, содержащих исходя из контрольных посевов 500—1000 микробных клеток в 1 $см^3$, готовят 3 смеси:

- по 1 $см^3$ каждого штамма E. coli (Lac+) и Shigella sonnei или Salmonella typhimurium (Lac-);
- по 1 $см^3$ штамма E. coli (Lac+) и разбавителя;
- по 1 $см^3$ штамма Shigella sonnei или Salmonella typhimurium (Lac-) и разбавителя.

Приготовленные смеси тщательно перемешивают. Из каждой смеси в соответствии с рассчитанной посевной дозой (по 50—100 мкл) засевают поверхностным методом не менее чем на 3 чашки с исследуемой средой. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

По окончании инкубации учитывают выраженность дифференциальных признаков при росте колоний тестового микроорганизма E. coli (Lac+), ферментирующего лактозу на исследуемой среде (характерный цвет колоний, среды) и их отсутствие в посевах тестового штамма Shigella sonnei или штамма Salmonella typhimurium (Lac-), не обладающего способностью к ферментации лактозы.

11.4.3.6 Оценка результатов

Дифференцирующие свойства среды считают удовлетворительными, если она обеспечивает определенный в паспорте перечень признаков и степень их выраженности у тестового штамма, обладающего искомыми свойствами. Результат заносится в журнал оценки питательной среды по биологическим показателям.

11.4.4 Определение процента извлекаемости (% всхожести)

Этот показатель позволяет выявить и оценить наличие и степень ингибирующего влияния исследуемой среды на E. coli по сравнению с контрольной средой. В качестве контрольной используют ранее проведенную неселективную среду.

Определение процента извлекаемости (% всхожести) особенно важно для сред, используемых в методах прямого количественного подсчета (прямой посев исследуемой воды на чашку или фильтр), где наличие даже относительного ингибирующего влияния среды на искомые микроорганизмы будет искажать результат и снижать чувствительность метода.

11.4.4.1 Методика исследования

Готовят инокуляты для посева и осуществляют расчет посевной дозы как указано в 11.4.2.1.3.

11.4.4.2 Посев на контрольную и исследуемую среду выполняют прямым посевом согласно 11.4.2.2.2.

11.4.4.3 Чашки с посевами инкубируют в термостате при (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

После инкубации подсчитывают количество колоний, выросших на каждой чашке. Общее количество колоний во всех повторах (не менее 5) на контрольной неселективной среде должно быть не менее 200. Вычисляют среднее арифметическое значение количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой средах.

11.4.4.4 Обработка результатов

Процент извлекаемости рассчитывают по формуле:

$$B_{сх\%} = \frac{C_{ис}}{C_{кс}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где $B_{сх\%}$ — процент всхожести на исследуемой среде;

$C_{ис}$ — среднее арифметическое значение количества колоний, выросших на исследуемой среде;

$C_{кс}$ — среднее арифметическое значение количества колоний, выросших на контрольной среде.

11.4.4.5 Оценка результатов

Среда признается приемлемой при условии, что различие между средними значениями количества колоний на контрольной и исследуемой средах не достоверно. При этом, как правило, % извлекаемости (всхожести) составляет не менее 80 %.

Расчет достоверности различий средних значений количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой средах, приведен в приложении В.

Результат заносится в журнал (формуляр) количественной оценки питательной среды по биологическим показателям (приложение А).

В случае получения достоверного различия результатов, исследование повторяют, удваивая количество повторов: не менее 10 чашек с общей численностью количества учитываемых колоний на неселективной среде не менее 400.

11.4.4.6 Оценка показателя ингибиции

Для оценки ингибирующих свойств среды Эндо (и ее аналогов) по отношению к микробамассоциантам используют тестовый штамм Staphylococcus aureus.

11.4.4.7 Подготовка инокулята

Разведения тестового штамма готовят и контролируют, как указано в 11.4.2.1.3.

11.4.4.8 Методика контроля

Взвесь штамма-ассоцианта из разведений 10^{-1} (10^8 микробных клеток в $см^3$) по 100 мкл засевают на 3 чашки Петри с испытуемой и контрольной (неингибиторной) средами. В качестве контрольной среды используется питательный агар. Через 24—48 ч инкубации при температуре (36 ± 2) °С определяют число колоний, сформировавшихся на испытуемой и контрольной средах.

11.4.4.9 Оценка результатов

Ингибирующие свойства среды являются удовлетворительными, если в разведении 10^{-1} отсутствует рост микроба-ассоцианта при наличии роста в контрольных посевах. Результат заносят в журнал (формуляр) оценки питательной среды (приложение А).

11.5 Контроль на этапе использования питательных сред

В процедуре анализа возможны нарушения использования питательных сред (перегрев, чрезмерная инкубация при высокой температуре и т. д.), приводящие к ухудшению их ростовых свойств. Кроме того, возможно неверное толкование полученного результата, вследствие слабой выраженности признака у исследуемого микроорганизма. Контроль на этом этапе позволяет минимизировать подобные проблемы.

Контроль сред на этапе использования включает:

- контроль температурного режима водяных бань, предназначенных для поддержания плотных питательных сред в расплавленном состоянии;
- учет времени нахождения среды в расплавленном состоянии;
- постановку положительного и отрицательного контролей каждой партии приготовленной питательной среды.

Данный вид контроля проводится при каждом использовании питательных сред.

11.5.1 Контроль времени нахождения питательной среды в расплавленном состоянии

Питательная среда не должна находиться в расплавленном состоянии более 8 ч. Повторное плавление плотной питательной среды не допускается.

11.5.2 Постановка положительного и отрицательного контролей

Постановку контролей осуществляют в процессе идентификации микроорганизмов при выполнении подтверждающих тестов.

11.5.2.1 Тестовые культуры

В качестве тестовых культур используют штаммы:

- E. coli (например, шт. М17-02 или шт. 1257, шт. АТСС 10536);
- Salmonella typhimurium (например, шт. 9640 или шт. АТСС 13311);
- Staphylococcus aureus (например, шт. 906 или шт. АТСС 6538);
- Pseudomonas aeruginosa (например, шт. АТСС 27853 или шт. АТСС 10145, шт. АТСС 15442);
- Aspergillus brasiliensis (например, шт. АТСС 16404);
- Candida albicans (например, шт. АТСС 10231 или шт. АТСС 24433);
- Enterococcus faecalis (например, шт. АТСС 29212);
- Pseudomonas fluorescens (например, шт. АТСС 948).

Накануне исследования тестовую культуру готовят, как указано в 13.3.4.

11.5.2.2 Методика контроля

Постановку положительного контроля осуществляют путем внесения одной петли агаровой культуры тестового штамма в пробирку с используемой средой (средами) для идентификации. Отрицательным контролем служит пробирка с аналогичной средой без посева. Обе пробирки маркируют и помещают в термостат вместе с посевами. Возможен метод посева по ГОСТ 26670.

11.5.2.3 Учет результатов

По истечении срока инкубации в пробирке с положительным контролем должен наблюдаться хорошо различаемый рост, со всеми типичными для него отличительными признаками, которые пред-

полагается выявлять на данной среде. Цвет индикатора среды должен изменяться на цвет, определяемый в паспорте среды как положительный результат утилизации данного углевода. В пробирке с отрицательным контролем среда должна находиться без изменений. Результаты положительного и отрицательного контролей заносятся в рабочий журнал основного исследования.

12 Правила приготовления серийных разведений

Разведением для микробиологических исследований служит раствор или суспензия исследуемого образца, смешанные с девятикратным количеством жидкости для разведения — разбавителем.

Приготовление разведений необходимо:

- при исследовании загрязненных вод в целях снижения количества микроорганизмов на единицу объема, для обеспечения возможности наблюдения за их ростом или подсчетом колоний;
- для постановки исследований, требующих количественного учета используемых модельных микроорганизмов, например при количественной оценке качества питательных сред, мембранных фильтров и т. д.

Приемлемое для учета число микроорганизмов составляет:

- для метода подсчета колоний на чашках Петри (90—100 мм) — от 15 до 300 колоний;
- для учета колоний на фильтре (47—50 мм) — от 15 до 100 колоний;
- для учета колоний на фильтре (35 мм) — от 15 до 60 колоний.

Важным моментом в процедуре приготовления разведений является равномерность распределения внесенных микроорганизмов по объему разбавителя. Равномерность распределения достигается тщательным перемешиванием полученной смеси встряхиванием или пипетированием. Достичь более качественных результатов позволяет использование специальных приборов — встряхивателя или вортекса.

В процессе приготовления разведений каждый образец с помощью прибора тщательно перемешивается в течение 5—10 с. Частоту вращения подбирают так, чтобы жидкость, которая образует воронку, не доходила до края пробирки на 2—3 см.

12.1 Разбавители

В качестве разбавителей при приготовлении разведений используют:

- пептонно-солевой: в 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 1,0 г пептона и 8,5 г натрия хлористого;
- физиологический раствор: в 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 8,5 г натрия хлористого.

Для приготовления разбавителя указанные компоненты растворяют в воде, при необходимости, с подогреванием. Доводят pH так, чтобы после стерилизации он был равен 7,0 ± 0,2 при 25 °С. Разливают разбавитель во флаконы. Стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин. Помимо перечисленных выше разбавителей, для приготовления разведений исследуемой воды допускается применение стерильной водопроводной воды.

12.2 Методика выполнения разведений исследуемой воды

Разведения исследуемого образца воды следует готовить непосредственно перед анализом и использовать для инокуляции не позже 30 мин с момента приготовления. В стерильные пробирки, количество которых соответствует выбранной степени разбавления исследуемой воды, асептически вносят по 9 $см^3$ разбавителя. В первую из пробирок, содержащих 9 $см^3$ разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, пипеткой вносят 1 $см^3$ хорошо перемешанной пробы воды, тщательно перемешивают.

Приготовленное первое разведение (10^{-1}) содержит в 1 $см^3$ суспензии 0,1 $см^3$ исходного образца. В следующую (вторую) пробирку, также содержащую 9 $см^3$ разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, новой пипеткой вносят 1 $см^3$ хорошо перемешанного первого разведения исследуемой пробы. Смесь тщательно перемешивают. Второе разведение (10^{-2}) в 1 $см^3$ суспензии содержит 0,01 $см^3$ исходного образца.

Процедуру приготовления разведений продолжают по описанной схеме до получения суспензии с необходимой концентрацией исходного образца.

12.3 Методика приготовления суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов

Приготовление суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов осуществляют с использованием оптического стандарта мутности, соответствующего 0,9—1 млрд. микробных кл/см^3.

В стерильную стандартную пробирку, прилагаемую к стандарту, вносят 3—4 см^3 разбавителя. Агаровую культуру тестового микроорганизма петлей переносят в пробирку и растирают по внутренней поверхности пробирки, постепенно смешивая с содержащимся в ней разбавителем.

Возможно приготовление бактериальной взвеси методом смыва выросшей культуры со скошенного агара 5 см^3 разбавителя.

Полученную взвесь микроорганизмов интенсивно перемешивают, добиваясь полного и равномерного распределения клеток. Мутность полученной взвеси сравнивают с мутностью оптического стандарта (возможно применение специальных приборов, предназначеных для измерения мутности клеточных суспензий в пределах диапазона 0,0—6,0 единиц МакФарланда (McF) (0—0,2×10^9 кл/см^3), который также предварительно тщательно перемешивают.

При визуальном несоответствии мутности приготовленной суспензии стандарту, ее доводят либо добавлением агаровой культуры, либо добавлением разбавителя. После каждого вносимого изменения суспензию тщательно перемешивают.

При совпадении мутности приготовленной суспензии и мутности оптического стандарта считается, что концентрация клеток тестовой культуры в данной суспензии примерно соответствует значению, указанному для данного стандарта (0,9—1×10^9 кл/см^3).

Для получения суспензии с нужной концентрацией тестового микроорганизма выполняют серийные разведения полученной стандартной суспензии описанным выше способом.

Для контроля правильности приготовления суспензии, правильности выполнения разведений и расчета заражающей дозы проводят контрольный высев в соответствии с 11.4.2.1.3.

13 Этапы сохранения микробиологических культур

13.1 Контрольные (референтные) штаммы микроорганизмов

В качестве контрольных (эталонных) штаммов используют тест-штаммы из официально признанных коллекций микроорганизмов, отличающиеся генетической стабильностью и изученными фенотипическими характеристиками, в том числе чувствительностью к антибактериальным препаратам. В условиях лаборатории штаммы должны иметь паспорт и храниться в соответствии с действующими на территории Российской Федерации санитарными правилами и нормами при работе с микроорганизмами III—IV групп патогенности таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культуры была минимальной.

Хранение культур осуществляется в соответствии с действующими на территории Российской Федерации санитарными правилами и нормами. Лаборатория должна иметь разрешение на работу с микроорганизмами III—IV групп патогенности. С учетом различной технической и материальной обеспеченности лабораторий возможны два варианты ведения эталонных бактериальных культур:

- без создания запаса эталонной культуры длительного хранения, не требующий специального оснащения;
- с созданием запаса эталонной культуры длительного хранения с применением криоконсервации, который следует рассматривать как оптимальный.

13.2 Для непродолжительного хранения «рабочих» штаммов их выращивают в пробирке со скошенным агаром и хранят в холодильнике при температуре 2—8 °С, субкультивируют в соответствии с ГОСТ ISO 11133 или другими утвержденными в установленном порядке методическими документами и стандартами или используют готовые культуры на петлях или в гранулах.

Рабочую культуру готовят накануне исследования. Для этого ее высевают со среды хранения (например, с полужидкого агара) в пробирки со скошенным питательным агаром, с питательным бульоном или на специальные питательные или дифференциальные среды (если готовые культуры на петлях или в гранулах).

Процесс ведения эталонных культур, в данном варианте, состоит из следующих блоков:

- восстановление и контроль лиофилизированной культуры;
- создание запаса рабочей культуры;

- хранение в полужидком агаре при температуре 4—8 °С;
- восполнение запаса рабочей культуры;
- подготовка культуры для целевого использования;
- контроль видовых и паспортных свойств.

Хранение запаса рабочей культуры в полужидком агаре при (4—8) °С не требует специального оснащения, но порождает необходимость восполнения запасов рабочей культуры путем получения ее субкультур на среде хранения каждые 3 месяца. Дополнительные пассажи через питательные среды могут привести к диссоциации штамма и потере тестовых свойств. Восполнять запас рабочей культуры разрешается только 3 раза (конец 3, 6 и 9-го месяцев) с момента его создания. Это ограничивает срок использования эталонной культуры, полученной из 1 ампулы, 1 годом, по истечении которого необходимо вскрыть новую ампулу с тестовой культурой.

Для длительного хранения штаммы находятся в лиофилизированном виде при температуре 4—6 °С или в виде суспензии микроорганизмов в стабилизирующем растворе в замороженном состоянии при температуре минус 70 °С и ниже в морозильной камере или в жидком азоте.

В случае необходимости (при длительном хранении) для повышения активности культуры ее необходимо предварительно провести через питательные бульоны.

Если «рабочие» культуры были контаминированы или имеет место снижение чувствительности, необходимо вернуться к исходным культурам.

13.3 Подготовка тестовой культуры для целевого использования

13.3.1 Восстановление лиофилизированной эталонной культуры

Оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки. Влажным концом стерильного ватного тампона прикасаются к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывают трехслойной марлевой салфеткой, смоченной 70 %-ным этиловым спиртом и хорошо отжатой и обламывают пинцетом.

После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1—2 мин. Затем салфетку осторожно снимают и вместе с остатками стекла погружают в дезраствор. В ампулу вносят 0,3 $см^3$ питательного бульона для регидратации. В качестве питательного бульона можно использовать мясопептонный бульон, сердечно-мозговой, триптон-соевый, тиогликолевый. Содержимое ампулы перемешивают, переносят стерильной пастеровской пипеткой или шприцем в пробирку с питательным бульоном и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки степени диссоциации эталонного штамма.

После инкубации из питательного бульона делают высев петлей на скошенный питательный агар в две пробирки (при восстановлении штамма E. coli $K12F^{+}Str^{r}$ посев осуществляется на скошенный питательный агар, содержащий стрептомицин). Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С 18—24 ч.

Одну пробирку с посевом используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым, паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для создания запасов рабочей культуры.

Культура с измененными свойствами в работу не допускается.

13.3.2 Создание запасов рабочей культуры

При удовлетворительном прохождении контрольных тестов культуру со скошенного питательного агара (например, для E. coli $K12F^{+}Str^{r}$ — с питательного агара со стрептомицином) засевают уколом в столбик с полужидким агаром. В зависимости от интенсивности работы лаборатории посев проводят в 4—7 пробирок, из расчета по 1—2 пробирки на 1 месяц работы и в 1 пробирку для восполнения запасов рабочей культуры через три месяца на следующий квартал. Посевы инкубируют 18—24 ч при (37 ± 1) °С. При наличии роста пробирки закрывают резиновыми пробками и закладывают на хранение при температуре 4—8 °С.

Одну из пробирок с культурой, предназначенной для восполнения рабочих запасов, маркируют и хранят отдельно. Запасы рабочей культуры желательно хранить в отдельном холодильнике.

13.3.3 Восполнение запасов рабочей культуры

Восполнение запасов рабочей культуры производится в конце 3, 6 и 9-го месяца с момента вскрытия ампулы (каждые 3 месяца).

Для восполнения запасов рабочей культуры используется субкультура на среде хранения, полученная ранее при создании запасов или при очередном их восполнении. Из пробирки с культурой, предназначенной для восполнения запасов, производят посев в питательный бульон. Посевы инкубируют

при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. Оставшуюся бульонную культуру (например, E. coli M17-02) используют для оценки степени диссоциации.

При наличии диссоциации (по размеру, S-R-диссоциация, др.) подсчитывают количество измененных колоний и общее количество просмотренных колоний. Общее количество просмотренных бактерий не должно быть менее 30. Затем рассчитывают процент диссоциации по формуле:

$$\% \text{ диссоциации} = \frac{\text{количество измененных колоний}}{\text{общее количество просмотренных колоний}} \cdot 100\ \% \cdot \quad (3)$$

Если процент диссоциированных колоний превышает 25 %, то данная культура не пригодна для дальнейшего использования.

После инкубации из питательного бульона делают высев петлей в две пробирки со скошенным питательным агаром. При ведении штамма E. coli K12F$^+$Str^r посев осуществляется на скошенный питательный агар, содержащий стрептомицин. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С 18—24 ч.

Один из посевов используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма видовым, паспортным свойствам. Второй посев на скошенном питательном агаре используют для восполнения запасов рабочей культуры.

При удовлетворительном прохождении контрольных тестов процедура закладки культуры на хранение осуществляется согласно 13.2, 13.3.5. Восполнение запасов рабочей культуры проводят только 3 раза. По истечении года использования необходимо получить новую эталонную культуру из коллекции микроорганизмов.

Контрольными тестами являются тесты на проверку жизнеспособности, оценку морфологических и биохимических свойств с применением селективных сред, возможно использование автоматических биохимических анализаторов или тест-систем для определения биохимических свойств.

13.3.4 Подготовка культуры для целевого использования в анализе

Накануне использования культуру с полужидкого агара высевают на 2 пробирки со скошенным питательным агаром (например, E. coli K12F$^+$Str^r пересевают на скошенный питательный агар, содержащий стрептомицин). Посевы инкубируют 18—24 ч при (37 ± 1) °С.

Культуру из одной пробирки используют по назначению с предварительной подготовкой согласно методическим документам. Вторая пробирка используется для получения культуры для работы на следующий (второй) день. При необходимости получения культуры тест-штамма на третий день высев снова производят с полужидкого агара.

13.3.5 Создание запасов эталонных штаммов

Параллельно с постановкой контрольных тестов из пробирки со скошенным питательным агаром культуру засевают в 2 пробирки с питательным бульоном или на две чашки Петри с агаром и инкубируют 18—24 ч при (37 ± 1) °С.

При удовлетворительном прохождении контрольных тестов в пробирке с суточной культурой проводят подготовку для сохранения культур в условиях низких температур (криоконсервации) в соответствии с 13.4.2. Криопробирки с запасом эталонной культуры устанавливают в криобокс (штатив для криопробирок) и закладывают на хранение при температуре минус (70 ± 10) °С. Альтернативным вариантом является хранение в жидком азоте при наличии соответствующего оборудования.

При инкубировании культур на чашках Петри с агаром процедуру подготовки и закладки для длительного хранения при температуре минус (70 ± 10) °С или для хранения в жидком азоте проводят в соответствии с 13.4.3.

Закладку запасов эталонной культуры на длительное хранение осуществляют единожды на весь период ее использования и запасы эталонной культуры при хранении в условиях низких температур восполнению не подлежат.

Данный блок выполняет задачу накопителя биомассы эталонного штамма, что позволяет избежать необходимости восполнять запасы рабочей культуры за счет повторных пассажей эталонного штамма через питательные среды и удлиняет «срок службы» культуры, полученной из одной ампулы.

13.3.6 Создание запасов рабочей культуры

Температуру криопробирки из запасов эталонной культуры доводят до комнатной температуры. Содержимое аккуратно перемешивают, вносят в пробирку с 8—10 см^3 питательного бульона и инкубируют при 37 °С 18—20 ч. После инкубации из питательного бульона выполняют высев в две пробирки со скошенным питательным агаром (для E. coli K12F$^+$Str^r — на питательный агар, содержащий стрептомицин). Посевы инкубируют в термостате 18—24 ч при 37 °С. Оставшуюся бульонную культуру используют для оценки степени диссоциации, как указано в 13.3.1.

Один из посевов на скошенном питательном агаре используют для постановки тестов на соответствие полученного штамма паспортным (типовым) свойствам. Второй посев используют для создания запасов рабочей культуры.

При несоответствии штамма видовым и паспортным свойствам использование культуры не допускается. В этом случае необходимо разморозить еще одну емкость с эталонной культурой и подвергнуть ее аналогичному исследованию.

Если культура снова не прошла контроль, ее снимают с хранения и в дальнейшем не используют. Необходимо получить новую ампулу с эталонной культурой и начать процедуру ведения тестового штамма сначала.

При удовлетворительном прохождении тестов культуру из пробирки со скошенным питательным агаром засевают уколом в 3—6 пробирок с полужидким агаром из расчета 1—2 пробирки на месяц в зависимости от интенсивности работы лаборатории. Посев инкубируют 18—24 ч при 37 °С. Пробирки закрывают резиновыми или силиконовыми пробками и хранят при 4—8 °С.

Запасы рабочей культуры создают 1 раз в 3 месяца, используя для этой цели новую пробирку из запаса эталонной культуры. Повторное замораживание размороженной эталонной культуры запрещается. Запасы рабочей культуры желательно хранить в отдельном холодильнике.

13.4 Подготовка культур микроорганизмов к процессу длительного хранения при низких температурах (криоконсервации)

13.4.1 Оборудование, расходные материалы и реактивы

Оборудование:

- автоклав вертикальный;
- термостат;
- микровстряхиватель или вортекс;
- низкотемпературный морозильник на минус 80 °С;
- одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 100—1000 мкл) с набором наконечников;
- криохранилища или сосуд Дюара, обеспечивающий возможность хранения в жидком азоте;
- водяная баня.

Расходные материалы и реактивы:

- пробирки типа Эппендорф;
- криопробирки с юбками и без, с завинчивающимися крышками со штриховым кодом и без него с бусами и без бус;
- соломины с хлопковой и гидрофобной пробкой в различных вариантах: 0,3; 0,5 и 1,0 $см^3$ со штриховым кодом и без него;
- стерильные пластиковые криопробирки с винтовой крышкой объемом 2,0 $см^3$;
- микробиологическая петля;
- спиртовка стеклянная;
- штатив пластиковый для пробирок;
- пластиковые коробки с ячейками;
- чашки Петри;
- этиловый спирт.

13.4.2 Подготовка культур микроорганизмов

Не менее 2-х для каждой коллекционной культуры стерильные пластиковые криопробирки с винтовой крышкой объемом 2,0 $см^3$ или пробирки типа Эппендорф, устойчивые к низким температурам, маркируют с указанием номера штамма и даты (месяц, год) криоконсервации. Разливают в подготовленные криопробирки по 900 мкл бактериальной бульонной суспензии, добавляют по 900 мкл стерильного 20 %-ного раствора глицерина и закрывают крышками. Вместо глицерина можно добавить по 0,1 мг сахарозы или лактозы, глюкозы, маннита, сорбита, декстрана, поливинилпирролидона, полигликоли, обеспечивающих защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны, тщательно перемешивают на микровстряхивателе или на вортексе.

Перед криоконсервацией из полученной бактериальной суспензии 100 мкл используют для определения жизнеспособности культуры. При этом бактериальную взвесь помещают на поверхность агаризованной среды, обеспечивающей оптимальный рост культуры, растирают шпателем с дальнейшим термостатированием при температуре инкубации, используемой для культивирования микроорганизма, который планируется сохранять.

После тщательного перемешивания на микровстряхивателе или на вортексе, заполненные криопробирки размещают в пластиковых контейнерах с ячейками, затем помещают в низкотемпературную камеру или морозильник на минус (70 ± 10) °С или в жидкий азот на минус 196 °С.

Перед использованием замороженный образец достают из места хранения, помещают на 45 с в водяную баню, прогретую заранее до (37 ± 1) °С, затем достают и размораживают при комнатной температуре в анаэробных или аэробных условиях, требуемых для его культивирования.

При частой разморозке криопробирок титр микроорганизмов снижается, поэтому размораживать несколько раз криопробирки с культурами не рекомендуется.

13.4.3 Процесс длительного хранения при низких температурах (криоконсервация) микроорганизмов, выросших на поверхности агаризованных питательных сред

Микроорганизмы рассевают по всей поверхности чашки Петри на питательной среде. В начале стационарной фазы роста микроорганизмы собирают с поверхности агара одноразовой бактериологической петлей (при этом металлические петли использовать не рекомендуется из-за возможного повреждения клеточной стенки) или ватным тампоном и помещают в 800 мкл среды для криозаморозки или криопротекторы, суспендируют с помощью микровстряхивателя или вортекса, затем помещают в низкотемпературный морозильник на минус (70 ± 10) °С или в жидкий азот.

13.4.4 Внутриклеточные криопротекторы и криозащитные среды

Выбор криопротектора или криозащитной среды зависит от вида бактерий. При замораживании новых штаммов следует предварительно проверить действие на них криопротектора.

13.4.4.1 Использование в качестве криопротектора 10%-ных растворов глицерина и ДМСО

Микроорганизмы помещают в криопробирки и добавляют по 1 $см^3$ 10%-ного раствора глицерина с ДМСО, перемешивают и затем помещают криопробирки в морозильную камеру при минус (70 ± 10) °С или в жидкий азот. Перед использованием криопробирку достают и размораживают при комнатной температуре. При этом глицерин стерилизуют автоклавированием в течение 20 мин при 121 °С и хранят при температуре 4—6 °С в течение 30 дней.

Стерилизацию ДМСО осуществляют фильтрованием, используя пористые свечи «Села» или установку стерилизующей фильтрации. ДМСО собирают порциями по 10—15 $см^3$ в стерильные пробирки и хранят в замороженном состоянии при температуре минус 5 °С (ДМСО замерзает при температуре минус 18 °С).

13.4.4.2 Использование в качестве криопротектора составных криозащитных сред

Подготавливают основу криозащитной среды из расчета на 500 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 2 г бактериологического сухого европейского агара, 2,5 г — NaCl, 1 г дрожжевого экстракта, 0,2 мг L-цистеин, 8,5 мг панкреатического гидролизата казеина, 5 г декстрозы. В 500 $см^3$ дистиллированной воды постепенно добавляют вышеуказанные ингредиенты, размешивают и доводят до кипения, затем кипятят в течение 5 мин до полного растворения бактериологического агара (оценку проводят визуально, по отсутствию комков на предметном стекле, для чего опускают предметное стекло в приготовленную среду, вынимают, дают возможность стечь и осматривают стекло на предмет отсутствия комков), при этом pH среды поддерживают в диапазоне (7,2 ± 0,2), разливают в стерильные флаконы емкостью 500 $см^3$. Основу криозащитной среды разливают по емкостям и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 110 °С. Основа составной криозащитной среды представляет собой полужидкий вязкий стерильный раствор, полностью готовый к использованию для сохранения микроорганизмов в условиях низких и сверхнизких температур. Условия хранения составной среды — при температуре 4—6 °С в течение 14 дней.

В стерильную основу криозащитной среды перед проведением заморозки культур микроорганизмов добавляют 10%-ный раствор глицерина в следующих пропорциях: на 100 $см^3$ среды 14 $см^3$ глицерина; 200 $см^3$ — 28 $см^3$ глицерина; 20 $см^3$ — 2,8 $см^3$ глицерина; 30 $см^3$ — 4,2 $см^3$ глицерина; 40 $см^3$ — 5,6 $см^3$ глицерина; 500 $см^3$ — 70 $см^3$ глицерина.

10 %-ный раствор глицерина готовят из концентрата глицерина путем разведения стерильной дистиллированной водой до соотношения 1:10 и стерилизуют в течение 20 мин при 121 °С. Хранят при температуре 4—6 °С в течение 30 дней.

Бактериальные культуры смывают или снимают ватным тампоном или стерильной одноразовой пластиковой бактериологической петлей (при этом металлические петли использовать не рекомендуется из-за возможного повреждения клеточной стенки) со всей поверхности питательной среды в криопробирки или пробирки типа Эппендорф, устойчивые к низким температурам, рассчитанные на 2 $см^3$, смешивают в соотношении 1:2 с криозащитной средой, перемешивают на вортексе в течение 2—5 мин до получения однородной массы, затем криопробирки завинчивают крышкой или защелкивают и по-

мещают в соответствующее хранилище, где подвергают немедленной заморозке, а затем оставляют для хранения при низких температурах до тех пор, пока не потребуется использовать эти культуры. Максимальное время хранения без пересева микроорганизмов при температуре минус (70 ± 10) °С составляет три года.

Оттаивание криопробирок с бактериальными культурами производят непосредственно перед проведением исследований, для чего требуемые для исследования образцы вынимают из низкотемпературного хранилища, размораживают в течение 45 с на прогретой заранее до температуры 37 °С водяной бане, затем образцы вынимают из водяной бани и оставляют при комнатной температуре до полного оттаивания. Затем содержимое пробирки высевают на чашки с питательными средами. Последующая заморозка после оттаивания микроорганизмов нежелательна.

13.5 Консервирование бактериальных культур высушиванием из замороженного состояния (лиофилизация)

13.5.1 Оборудование

В зависимости от способа размещения биопрепаратов при высушивании различают сублимационные установки коллекторного и камерного типа.

В коллекторных установках ампулу, флакон, колбу с биопрепаратом (каждый элемент в отдельности) во время сушки связывают с устройством для улавливания водяных паров (конденсатором) индивидуальным трубопроводом.

В камерных установках сосуды с препаратами помещают в общую сушильную камеру, где и осуществляется, как правило, весь цикл высушивания препарата.

По принципу работы сублимационные установки подразделяются на периодические, поточно-циклические и установки с непрерывным действием.

13.5.2 Подготовка культур к сушке

Качество лиофилизации зависит от качества используемых микробных клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях выросли.

Выращивают достаточно большое количество клеток на поверхности питательного агара в чашке Петри так, чтобы в суспензии содержалось не менее 10^8 кл/см^3, при этом посев чистых бактериальных культур осуществляют газоном. Их собирают в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры, т. е. в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста (для большинства культур суточные).

13.5.3 Защитные среды

Для подготовки клеток к лиофилизации их суспендируют в среде, содержащей растворы защитных сред. В качестве криопротекторов используют:

- декстран (10%);
- инозит (5 %);
- глутамат (5 %);
- раффиноза (5 %);
- пептон (0,1—10 %);
- сахароза (10 %);
- лактоза (10 %);
- трегалоза (10 %);
- обезжиренное молоко (10—20 %);
- натрия глутамат (5 %);
- гидролизат казеина;
- 12 %-ный раствор сахарозы;
- лошадиная сыворотка;
- глюкозо-желатиновая среда;
- сахарозо-желатиновая среда.

13.5.4 Подготовка стабилизатора-носителя, в котором проводят лиофилизацию культур

Готовят 20 %-ное снятое цельное молоко и стерилизуют его порциями по 15—20 см^3 при температуре 112 °С в течение 15 мин. Следует избегать перегрева, так как при этом может произойти карамелизация молока.

Обезжиренное молоко готовят путем центрифугирования цельного молока (3500 об/мин, 40 мин), затем образовавшийся плотный слой жира удаляют и обезжиренное молоко (обрат) автоклавируют при температуре 117 °С в течение 15 мин.

13.5.5 Способ приготовления сахарозо-желатиновой или глюкозо-желатиновой сред

К 100 мл дистиллированной воды добавляют 1 г желатина и 5 г сахарозы (5 г глюкозы). Дают постоять среде 2 ч при комнатной температуре. Затем стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

В стерильных условиях микробные клетки, выращенные в бульоне (с сердечно-мозговой вытяжкой, триптон-соевом, бруцелла, шадлера, мясо-пептонный и др.), отделяют в стерильных условиях центрифугированием, затем суспендируют осадок в защитной среде, чтобы получилась суспензия, содержащая не менее 106 кл/см^3. Эту же процедуру применяют и в том случае, когда в качестве защитной среды используется сахароза, декстран (10 %), лошадиная сыворотка, инозит и другие вещества.

13.5.6 Заполнение ампул или пенициллиновых флаконов микробной суспензией

В каждую ампулу или пенициллиновый флакон из нейтрального стекла (45 × 10 мм) в зависимости от ее объема наливают от 1 до 3 см^3, т. е. 20 % (вес/объем) суспензии с микробными клетками, содержащей 10 % (вес/объем) стабилизатора-носителя, затем закрывают стерильной негигроскопической ватной пробкой и подравнивают ее ножницами. После приготовления суспензии ее следует разлить по ампулам как можно быстрее. Интервал между разливом и процессом лиофилизации должен быть сведен до минимума, чтобы избежать осаждения клеток и других изменений в культуре. Вставляют ватные пробки на глубину приблизительно 1,3 см ниже края ампулы и обжигают их верхнюю часть, чтобы убрать лишние волокна ваты.

13.5.7 Процедура лиофилизации

Готовые для лиофилизации флаконы с защитной средой и микробными культурами непосредственно перед лиофилизацией помещают в морозильные камеры на минус (70 ± 10) °С не менее чем на 16 ч, достают непосредственно перед процедурой лиофилизации и ставят в разогретую лиофильную камеру. Общая продолжительность цикла высушивания составляет не более 50 ч. После высушивания флаконы герметизируют в стерильных условиях.

13.5.8 Хранение

Лиофилизованные культуры хранят при температуре 4—6 °С. С понижением температуры растет и сохраняемость микробных клеток. При комнатной температуре лиофилизованные культуры хранить не рекомендуется.

13.6 Восстановление (реактивация) культур из лиофилизата

Лиофилизованную культуру переводят в суспензию сразу после вскрытия ампул, добавляя в каждую от 0,3 до 1,0 см^3 соответствующей стерильной жидкой среды. Суспензию в ампулах хорошо перемешивают и переносят в пробирки с 5 см^3 жидкой среды (питательного бульона). После тщательного перемешивания инокулят с культурами термостатируют в течение 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С, затем отбирают 0,2 см^3 суспензии и наносят на твердую агаризованную питательную среду или полужидкую среду того же состава (питательный бульон). Рост бактерий, подвергавшихся лиофилизации, часто начинается после длительной лаг-фазы. Поэтому нельзя делать заключение о гибели культуры, если инкубация была недостаточно длительной.

13.7 Проверка жизнеспособности восстановленных бактерий после лиофилизации

Чтобы определить, насколько эффективен процесс высушивания бактерий из замороженного состояния, проверяют их жизнеспособность как до, так и после лиофилизации культуральным методом, а также методом покраски на живые и мертвые с применением набора для флуоресцентной окраски клеток или трипанового синего.

Для этого суспензию клеток стерильно разводят и делают посев штрихом на твердые среды. Пробирки и чашки со средой инкубируют при оптимальной для бактерий температуре и, как только начинается их рост, делают пересев на свежую среду, чтобы убедиться в чистоте культуры.

При использовании метода оценки живых и мертвых бактерий 100 мкл бактериальной суспензии смешивают 1:1 с флуоресцентной краской клеток или трипановым синим, пепетируют и проводят оценку в камере Горяева под микроскопом.

13.8 Консервирование высушиванием из жидкого состояния

13.8.1 Подготовка клеток для L-высушивания

Для высушивания используют клеточную суспензию с плотностью не менее 10^8 кл/см^3 в подходящей защитной среде. В случае жидких культур клетки собирают стерильным центрифугированием

(4000 об/мин, 30 мин) с последующим суспендированием осадка при помощи стеклянных шариков в защитной среде.

13.8.2 Заполнение ампул микробной суспензией

Готовые ампулы (содержащие тонкий диск стабилизатора-носителя) выдерживают несколько минут при температуре 20—25 °С. В каждую ампулу стерильно вносят около 0,025 $см^3$ (одна капля с пипетки Пастера) клеточной суспензии, осторожно капая на тонкий диск, чтобы не коснуться стенок ампулы. После приготовления суспензии ее следует разлить по ампулам как можно быстрее. Интервал между разливом и процессом лиофилизации должен быть сведен до минимума, чтобы избежать осаждения клеток и других изменений в культуре. Вставляют ватные пробки на глубину приблизительно 1,3 см ниже края ампулы и обжигают их верхнюю часть, чтобы убрать лишние волокна ваты.

13.8.3 Высушивание

Заполненные ампулы быстро ставят на металлический поддон, который переносят в металлическую камеру на водяной бане при температуре 20 °С. После 20—30 мин эквилибрации образцов включают вакуумный насос, который отсасывает влагу из сушильной камеры. При этом влага конденсируется на холодной ловушке (приблизительно минус 35 °С).

В технологии сушки из жидкого состояния различают две стадии — первичное и вторичное высушивание.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры формуляров для записи результатов контроля

А.1 Формуляр для записи результатов контроля микробной обсемененности воздуха

	Наименование организации	Формуляр…….. действует с: ……..... Стр……. из …….....
	Испытательный лабораторный центр Микробиологическая лаборатория	
	Контроль обсемененности воздуха	

Дата посева	Питательные среды. Результат	Дата окончания исследования	Подпись исполнителя	Дата посева	Питательные среды. Результат	Дата окончания исследования	Подпись исполнителя
	МПА				МПА		
	ЖСА				ЖСА		
	Сабуро				Сабуро		
	МПА				МПА		
	ЖСА				ЖСА		
	Сабуро				Сабуро		

Аспирационным методом: МПА — 100 л — 37 °С 24 ч; ЖСА — 250 л — 37 °С 48 ч; Сабуро — 250 л до 5 сут. ОМЧ — не более 500 КОЕ/м³; S. aureus — отсутствие; дрожжевые и плесневые грибы — отсутствие.

Составил:

Дата введения:

Проверил:

А.2 Формуляр контроля паразитарной загрязненности воздуха и пыли

	Наименование организации	Формуляр…….. действует с: ……..... Стр…..... из .....
	Испытательный лабораторный центр Паразитологическая лаборатория	
	Контроль паразитарной загрязненности воздуха и пыли в паразитологической лаборатории (комната, помещение или бокс и т.д.)	

Дата проведения исследования	Вид исследования	Всего количество отобранных проб для исследования	Применяемая методика при исследовании проб	НД на методы исследования	Место отбора пробы (название или номер помещения, бокса и т. д.)	Яйца гельминтов		Фамилия и подпись проводившего исследование
						Обнаружено	Не обнаружено	
						При обнаружении дается краткая характеристика объекта и указывается количество обнаружения в пробе		

Примечание — Периодичность проведения контроля устанавливается в плане производственного контроля лаборатории.

А.3 Формуляр для записи результатов контроля микробной обсемененности лабораторной посуды

	Наименование организации	Формуляр…….. действует с: ……..... Стр…..... из .....
	Испытательный лабораторный центр Микробиологическая лаборатория	
	Контроль обсемененности лабораторной посуды (ЛП)	

Дата/ наименование ЛП	ОМЧ*			Сульфитредуцирующие клостридии (железосульфатный агар 44 °С 18 ч)**			Результат	Дата окончания исследования	Подпись исполнителя
	МПБ (20 % от объема флакона) 36 ± 2 °С 48 ч	МПА 36 ± 2 °С 48 ч							
		Контроль посуды	Контроль среды	Стерильная водопроводная вода (20 % от объема флакона)	Контроль посуды	Контроль стерильности водопроводной воды			
Флаконы	100,0 100,0 100,0	1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0	1,0	100,0 100,0 100,0	100,0 100,0 100,0	100,0			
Чашки Петри	10,0 10,0 10,0	1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0							
Пробирки	5,0 5,0 5,0	1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0							
Пипетки	1,0 1,0 1,0	1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0							

* ОМЧ — 1 раз в неделю.

** Сульфитредуцирующие клостридии — 1 раз в квартал.

Составил:

Дата введения:

Проверил:

А.4 Формуляр для записи результатов контроля паразитарной загрязненности поверхностей в лаборатории

	Наименование организации	Формуляр…….. действует с: ……..... Стр……. из …….....
	Испытательный лабораторный центр Микробиологическая (паразитологическая) лаборатория	
	Контроль качества проведения дезинфекционных мероприятий в паразитологической лаборатории (комната, помещение или бокс и т. д.) методом смыва	

Дата проведения исследования	Вид исследования	Всего количество отобранных проб для исследования	Применяемая методика при исследовании проб	НД на методы исследования	Место/поверхность, с которого отбирается смыв	Результат исследования		Фамилия и подпись проводившего исследование
						Яйца гельминтов	Цисты/ооцисты патогенных простейших	
		В одном помещении рекомендуется отбирать не менее 10 проб						

Примечание — Периодичность проведения контроля устанавливается в плане производственного контроля лаборатории.

А.5 Формуляр для записи результатов контроля качества питательных сред

	Наименование организации	Формуляр…….. действует с: ……..... Стр…..... из .....
	Испытательный лабораторный центр Микробиологическая лаборатория	
	Результат внутренних испытаний питательных сред, приготовленных лабораторией	

Наименование питательной среды:							
Внешний вид упаковки:							
Внешний вид питательной среды:		Этап взвешивания навески среды и растворения. Приготовленный объем:		Этап кипячения, мин	Этап внесения добавок до стерилизации	Режим стерилизации: t_0, мин	Этап внесения добавок после стерилизации
Ожидаемый:	Наблюдается:						
Обезвоженная среда (и код) серия, срок годности:	Производитель:	Количество:	Количество ДВ:				
Добавка серия, срок годности:	Производитель:	Количество:	Количество ДВ:				
Физический контроль качества							
Ожидаемое значение pH	Измеренный pH	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Дефекты:		Дата/подпись	
Ожидаемое заполняющее количество и/или толщина слоя:	Наблюдается:	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Дефекты:		Дата/подпись	
Ожидаемый цвет:	Наблюдается:	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Дефекты:		Дата/подпись	
Ожидаемая прозрачность/присутствие оптических артефактов:	Наблюдается:	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Дефекты:		Дата/подпись	
Ожидаемые стабильность/постоянство/влажность геля:	Наблюдается:	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Дефекты:		Дата/подпись	
Микробное загрязнение							
Номера испытуемых чашек или пробирок:	Результат:	Качество подтверждено: да ☐ нет ☐		Номера загрязненных чашек или пробирок:		Дата/подпись	
Инкубация:							

Окончание

<table>
<tr><td colspan="2">Микробиологический рост — Производительность</td><td colspan="3">Метод контроля: количественный ☐ качественный ☐</td></tr>
<tr><td>Штаммы:

Инкубация:
Эталонная среда:</td><td>Критерии:</td><td>Результат:</td><td>Качество подтверждено:
да ☐ нет ☐</td><td>Дата/подпись</td></tr>
<tr><td colspan="2">Микробиологический рост — Селективность</td><td colspan="3">Метод контроля: количественный ☐ качественный ☐</td></tr>
<tr><td>Штаммы:

Инкубация:
Эталонная среда:</td><td>Критерии:</td><td>Результат:</td><td>Качество подтверждено:
да ☐ нет ☐</td><td>Дата/подпись</td></tr>
<tr><td colspan="2">Микробиологический рост — Специфичность</td><td colspan="3">Метод контроля: количественный ☐ качественный ☐</td></tr>
<tr><td>Штаммы:

Инкубация:
Эталонная среда:</td><td>Критерии:</td><td>Результат:</td><td>Качество подтверждено:
да ☐ нет ☐</td><td>Дата/подпись</td></tr>
<tr><td colspan="5">Выпуск партии</td></tr>
<tr><td>Подробности хранения</td><td colspan="3">Выпуск партии: да ☐ нет ☐</td><td>Дата/подпись</td></tr>
</table>

Результат внутренних испытаний питательных сред, приготовленных лабораторией

Составил:

Дата введения:

Проверил:

Приложение Б
(обязательное)

Методы санитарно-паразитологического исследования смывов с поверхностей, воздуха и пыли для проведения внутрилабораторного контроля

Б.1 Исследование смывов с поверхностей при осуществлении внутрилабораторного контроля в паразитологических лабораториях (комнатах, помещениях)

Б.1.1 Отбор проб и подготовка к исследованию

При определении обсемененности возбудителями паразитарных болезней в лабораториях (комнатах, помещениях), задействованных в паразитологических исследованиях не реже 1 раза в месяц, отбираются смывы с поверхностей.

Смывы берут с любых поверхностей в лаборатории (комнате, помещении), непосредственно задействованных в паразитологических исследованиях (столы, стены, рабочие поверхности микроскопов, лотки, руки, халаты, спецодежда персонала, ручки дверей, ручки и поверхности раковин, поверхности фильтровальных установок, полы, санузел лаборатории и т. д.)

Для отбора смывов применяют кисточки из щетины, беличьи кисточки, смоченные в 1 %-ном растворе едкого натра, или в 10 %-ном растворе глицерина, или 1 %-ном растворе стирального порошка. В центрифужные пробирки наливают до половины объема 10 %-ный раствор глицерина. Для каждой группы предметов берут отдельную пробирку и кисточку, которые нумеруются (номер кисточки и пробирки должны совпадать). В одну пробу, т. е. в пробирку, можно собирать смывы с нескольких однородных предметов (например: столы, рабочие поверхности микроскопа, ручки дверей и т. д.).

Смывы с рук персонала берут у каждого отдельно, чтобы при обнаружении яиц гельминтов или/и цист кишечных простейших можно было знать, какой именно сотрудник нарушает правила гигиены.

Для снятия яиц гельминтов с рук персонала рекомендуется мыть их раствором питьевой соды или 1 %-ным раствором едкого натра; смывные воды центрифугируют, осадок можно также профильтровать в аппарате Гольдмана и затем исследовать фильтры.

При взятии смывов с поверхностей кисточкой, смоченной в растворе, многократно и с нажимом проводят по поверхности однородных предметов обследуемого объекта. Причем кисточку в процессе отбора часто и тщательно ополаскивают в пробирке и вновь делают смывы с поверхности предметов.

Площадь исследуемой поверхности для одной пробы смывов составляет не менее 0,25 м^2 (0,5×0,5 м).

После отбора проб пробирки с вложенными в них кисточками в штативах доставляются на паразитологическое исследование.

Этикетирование целесообразно проводить не для каждой отдельной пробирки.

Б.1.2 Исследование смывов на яйца гельминтов

Б.1.2.1 Метод центрифугирования

Ход исследования

Кисточки со смывами ополаскивают в жидкости пробирки.

Центрифугируют полученные пробы в этих же пробирках, надосадочную жидкость сливают.

Осадок помещают на предметное стекло и микроскопируют.

Плотный осадок делят на несколько предметных стекол.

Б.1.2.2 Флотационный метод

Ход исследования

В пробирку со смывом добавляют 5—6 см^3 флотационного раствора, в котором тщательно и многократно промывают кисточку в течение 3—5 мин вертикальными и круговыми движениями, после чего кисточку сразу удаляют из пробирки.

В пробирку доливают флотационный раствор до образования выпуклого мениска, накрывают ее обезжиренным покровным стеклом до полного соприкосновения с поверхностной пленкой раствора.

Время экспозиции 12—15 мин.

При использовании флотационного раствора хлорида натрия — 20—25 мин. Затем покровное стекло снимают пинцетом и полученную висячую каплю на покровном стекле аккуратно переносят на предметное стекло в каплю 50%-ного раствора глицерина. Полученный препарат микроскопируют при 80—150-кратном увеличении.

Готовить пробы к исследованию одновременно следует партиями не более 5—6 пробирок, так как при большом количестве пробирок увеличивается время экспозиции, и яйца, поднявшиеся в поверхностную пленку, покрываются кристаллами соли, что затрудняет их обнаружение.

Б.1.3 Исследование смывов на цисты простейших

Б.1.3.1 Метод Романенко

Ход исследования

Кисточки со смывом ополаскивают в жидкости пробирки, затем сливают эту жидкость в высокий цилиндр емкостью 0,5—1,0 дм^3 с чистой водой, которую наливают с таким расчетом, чтобы при добавлении смыва не пре-

высить общую емкость цилиндра. Всплывшие на поверхность жидкости кусочки бумаги, ткани и другие крупные частицы удаляют петлей с сеткой, а оставшуюся жидкость отстаивают в течение 12—16 ч, надосадочную жидкость удаляют, а осадок микроскопируют, окрашивая 1 %-ным раствором Люголя.

Б.1.3.2 Метод иммуномагнитного разделения и мечение флуоресцирующими антителами (ИМС) на определение цист и ооцист кишечных простейших.

Б.1.4 Материал, оборудование и реактивы

Магнитный штатив.

Автоматические пипетки на 1—10 мкл, 20—200 мкл и 100—1000 мкл.

Наконечники для автоматических пипеток.

Градуированная пипетка на 10 $см^3$.

Лабораторный вортекс.

Лабораторный ротатор.

Пробирки для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирки или плоскостенные пробирки) или обычные центрифужные.

Штатив для ИМС-пробирок.

Пробирки типа Эппендорф на 1,5 $см^3$.

Штатив для пробирок типа Эппендорф.

Флуоресцентный микроскоп с набором необходимых фильтров и принадлежностей в рекомендованной комплектации или насадка на микроскоп ОптиЛюм.

Стекла предметные SuperStick™: S100-2 (два окна), или обычные предметные стекла.

Пастеровские пипетки.

Буфер для иммуномагнитной сепарации Grab™ Buffer A (1), 2-концентрированный.

Иммуномагнитная суспензия Giardia-Grab™ IMS Beads (2), специфичная к цистам лямблий.

Иммуномагнитная суспензия Crypto-Grab™ IMS Beads (3), специфичная к ооцистам криптоспоридий.

Моющий буфер Grab™ Buffer B (4).

Таблетированный фосфатный буфер PBS (6).

DAPI концентрированный раствор (7), 2 $мг/см^3$.

DAPI в метаноле.

Моющий буфер SureRinse™ (8).

Иммунореагент Aqua-Glo™G/C (9) в рабочем разведении.

Положительный контроль (10).

Контрастирующий краситель (11), C101.

Защитная среда (12) No-Fade™, M101 или E1-vanol No-Fade™, M102.

Метанол.

0,1 Н раствор соляной кислоты.

1 Н раствор NaOH.

Примечание — Допускается использование материалов, оборудования и реактивов иных производителей с аналогичными характеристиками, но не ниже указанных.

Б.1.5 Подготовка проб (смывов) к исследованию

Подготовка проб (смывов) к исследованию после фильтрации смыва с рабочих поверхностей осадок с фильтров (МФАС или АТМ) смывают в 10 $см^3$ дистиллированной воды, переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Затем удаляют надосадочную жидкость и проводят исследование осадка. При этом осадок должен быть не более 1 $см^3$. Если получился больший объем осадка, его необходимо ресуспендировать дистиллированной водой.

В одной ИМС-пробирке обрабатывается не более 0,5 $см^3$ концентрата пробы, ресуспендированного в 3 $см^3$ дистиллированной воды. Больший объем осадка необходимо перемешать с дистиллированной водой, разделить на части, в каждой из которых должно содержаться не более 0,5 $см^3$ исходного осадка, и далее обрабатывать как две и более пробы.

Примечание — Диагностические наборы с иммунореагентами и буферными растворами перед использованием выдержать в течение одного часа при комнатной температуре.

Б.1.6 Иммунохимическое связывание, магнитная сепарация и промывка

С помощью градуированной пипетки на 10 $см^3$, предварительно омытой дистиллированной водой, перенести в пробирку для иммуномагнитной сепарации (ИМС-пробирку или плоскостенную пробирку) исследуемый концентрат, ресуспендированный в 3 $см^3$ дистиллированной воды. Омыть пробирку, в которой находился концентрат, двумя порциями дистиллированной воды по 1 $см^3$, оба смыва перенести в пробирку для иммуномагнитной сепарации. Общий объем раствора в пробирке для ИМС составит 5 $см^3$. Внести в пробирку для ИМС 5 $см^3$ 2-концентрированного буфера Grab™ Buffer A (1). Плотно закрыть крышку пробирки и перемешать раствор, переворачивая пробирку 3 раза. По выполнении всех процедур переноса пробы общий объем раствора в ИМС-пробирке составляет 10 $см^3$.

Перемешать иммуномагнитную суспензию Giardia-Grab™ IMS Beads (2) на вортексе в течение 20 с, отобрать 100 мкл суспензии и перенести ее в ИМС-пробирку, в которой уже находится проба. Перемешать иммуномагнитную суспензию Crypto-Grab™ IMS Beads (3) на вортексе в течение 20 с, отобрать 100 мкл суспензии и перенести ее в пробирку для ИМС, в которой уже находится проба. Закрепить пробирку для ИМС в штативе лабораторного ротатора перпендикулярно к оси вращения. Перемешивать в течение 1 ч при скорости 18 об/мин при комнатной температуре. Извлечь ИМС-пробирку из ротатора. Поместить ее в магнитный штатив плоской стороной к магниту. Бережно покачивать штатив с пробиркой вручную в течение 3 мин, поворачивая ее на 90° от себя/на себя, при этом плоская сторона пробирки должна находиться снизу.

Остановив покачивание в вертикальном положении пробирки и не вынимая ее из магнитного штатива, осторожно вылить надосадочную жидкость из пробирки. Не вынимая ИМС-пробирку из штатива и не касаясь магнитного осадка на стенке, отобрать остатки жидкости со дна пробирки с помощью пастеровской пипетки.

Извлечь пробирку из штатива, добавить в пробирку 0,48 см^3 буфера Grab™ Buffer B (4). Поворачивая пробирку, осторожно смыть суспензию с плоской стенки. С помощью пастеровской пипетки омыть плоскую стенку пробирки.

С помощью пастеровской пипетки перенести 0,48 см^3 суспензии в пробирку типа Эппендорф на 1,5 см^3.

Дважды омыть плоскую стенку ИМС-пробирки 0,48 мл буфера Grab™ Buffer B, осторожно поворачивая пробирку и используя ту же пастеровскую пипетку. Последовательно перенести оба смыва в пробирку типа Эппендорф на 1,5 см^3 с помощью одной пастеровской пипетки, при этом избегать образования пузырей. Подождать примерно 15 с и перенести остатки жидкости из ИМС-пробирки в ту же пробирку типа Эппендорф.

Закрыть крышку пробирки типа Эппендорф и поместить ее в магнитный штатив. Бережно покачивать штатив с пробиркой вручную в течение 1 мин, поворачивая ее на 180° от себя/на себя, при этом пробирка должна находиться сверху.

Не вынимая пробирку типа Эппендорф из магнитного штатива и не касаясь суспензии на стенке пробирки, с помощью пастеровской пипетки осторожно отобрать всю жидкость из пробирки.

Б.1.7 Диссоциация

Извлечь пробирку типа Эппендорф из магнитного штатива, добавить в пробирку 50 мкл 0,1 Н раствора соляной кислоты. Перемешать суспензию на вортексе в течение 50 с.

Инкубировать пробирку в течение 10 мин при комнатной температуре.

Перемешать суспензию в микроцентрифужной пробирке на вортексе в течение 30 с.

Установить пробирку в магнитный штатив. Через 30 с осторожно, не касаясь осадка на стенке пробирки, с помощью автоматической пипетки отобрать 50 мкл супернатанта и перенести его в окно предметного стекла (слайда) SuperStick™ (5), в котором находится 6 мкл 1,0 Н раствора NaOH.

Повторить процедуры диссоциации. Обе порции исследуемого раствора можно внести в одно и то же или в два окна предметного стекла (слайда) SuperStick™ для последующего иммунофлуоресцентного мечения. Внести в окно предметного стекла (слайда) положительный контроль с цистами лямблий и криптоспоридий (контрольный образец прилагается и находится в диагностическом наборе), предварительно ресуспендированный с помощью вортекса за 20 с.

Подсушить предметное стекло (слайд) SuperStick™ в потоке теплого (не горячего) воздуха или с помощью устройства для сушки предметных стекол (слайдов) (примерно 15—30 мин).

Б.1.8 Подготовка к иммунофлуоресцентному мечению

Растворить 1 таблетку таблетированного фосфатного буфера (6) в 100 см^3 дистиллированной воды.

Приготовить рабочий раствор DAPI: развести 1 мкл 500х-концентрированного раствора (7) из диагностического набора в 5 см^3 готового фосфатного (PBS) буфера. Рабочий раствор DAPI необходимо готовить в день выполнения исследования. Использовать только свежеприготовленный рабочий раствор DAPI. Избегать воздействия прямого солнечного света.

Примечание — Для фиксации цист и ооцист на предметном стекле (слайде) внести в каждое окно предметного стекла (слайда) по 45 мкл абсолютного метанола и высушить (примерно 30 мин). После фиксации метанолом интенсивность флуоресценции DAPI возрастает.

Б.1.9 Флуоресцентное и иммунофлуоресцентное мечение

Убедиться в завершении сушки предметного стекла (слайда). Внести в окна предметного стекла (слайда) 50 мкл рабочего раствора DAPI. Инкубировать при комнатной температуре приблизительно 1 мин. Внести в окна слайда 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить предметное стекло (слайд) (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер, не касаться при этом поверхности окна предметного стекла (слайда).

Внести одну каплю (ок. 45 мкл) иммунореагента AquaGlo™ G/C (9) в окна предметного стекла (слайда). При необходимости, с помощью аппликатора или стеклянной палочки распределить реагент по лунке, не касаться при этом поверхности окна предметного стекла (слайда).

Поместить препараты в ячейку влажности и инкубировать не менее 25 мин при 37 °С или не менее 40 мин при комнатной температуре. Допускается более длительное время инкубации.

Внести в окна предметного стекла (слайда) 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить предметное стекло (слайд) (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер, не касаться при этом поверхности окна предметного стекла (слайда).

Примечание — Чтобы снизить неспецифическую флюоресценцию и выделить контрастный фон для лучшего наблюдения зеленой флюоресценции цист и ооцист, используется следующая процедура: нанести по одной капле контрастирующего красителя (11) в каждую лунку, инкубировать 1 мин при комнатной температуре. Внести в окна предметное стекла (слайда) 50—100 мкл моющего буфера SureRinse™ (8), подождать 1 мин. Осторожно наклонить предметное стекло (слайд) (узким краем вниз) и с помощью фильтровальной бумаги удалить моющий буфер, не касаться при этом поверхности окна предметного стекла (слайда).

Разложить препараты на наклонном штативе для предметных стекол (слайдов), подсушить в токе теплого воздуха.

Нанести 1 каплю защитной среды (12) No-Fade™ в каждую лунку. Нанести покровное стекло.

Примечание — Меченые препараты должны храниться в темноте при температуре (5 ± 3) °С. Не допускать замораживания. Меченые препараты, защищенные средой No-Fade™, могут храниться при температуре (5 ± 3) °С в течение по крайней мере 6 месяцев.

Б.1.10 Люминесцентная микроскопия

Исследуют препараты не менее чем при 100-кратном общем увеличении на наличие яблочно-зеленой флюоресценции, микроскопируя все поля зрения лунки предметного стекла (слайда). При использовании каждой новой партии реагентов и перед началом микроскопии препаратов исследуемых проб следует предварительно просмотреть препарат положительного контроля, для чего используется контрольная суспензия с точно подсчитанными цистами лямблий и ооцистами криптоспоридий, прилагаемая в диагностическом наборе.

Результат:

- цисты лямблий — светящиеся и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты, от овальных до сферических (от 10 до 18 мкм в диаметре), с ярко подсвеченными краями;
- ооцисты криптоспоридий — сверкающие и флюоресцирующие яблочно-зеленым светом объекты, от овальных до сферических (от 2,5 до 6 мкм в диаметре), с ярко подсвеченными краями.

Б.2 Санитарно-паразитологическое исследование пыли и воздуха в помещениях для осуществления внутрилабораторного контроля

Б.2.1 Отбор проб и подготовка к исследованию

Для сбора пыли используют камеру, представляющую собой металлический цилиндр длиной 110—120 мм с внутренним диаметром 27 мм [по ширине стандартного предметного стекла (слайда)]. В стенке цилиндра имеется всасывающее отверстие размером 2 × 25 мм. Внутри цилиндра укреплены 2 стержня, фиксирующие предметное стекло (слайд) в диаметральной плоскости и продольном направлении. С одного конца цилиндр закрывают съемной крышкой, а открытым концом присоединяют к патрубку пылесоса или другого всасывающего устройства (аспиратор, воздуходувка и т.п.).

На одну сторону чистого предметного стекла (слайда) наносят тонкий слой 50 %-ного раствора глицерина в виде полоски шириной 1,5—2,0 см и длиной 4—5 см. Предметное стекло (слайд) вставляют в камеру так, чтобы смазанная глицерином поверхность была обращена к всасывающему отверстию камеры. Камеру закрывают крышкой. Затем включают пылесос или другое всасывающее устройство и производят отбор пыли.

При отборе проб всасывающее отверстие камеры должно быть обращено к исследуемой поверхности и находиться на расстоянии 2—3 мм. Перемещать всасывающее устройство во время работы над поверхностью следует равномерно. На одну пробу собирают пыль с площади не менее 0,25 м^2 в течение 20 с, воздуха — 60 с. После отбора пробы пылесос или другое всасывающее устройство выключают, открывают камеру и извлекают предметное стекло (слайд). На смазанной стороне предметного стекла (слайда) будет отчетливо виден пылевой след, представляющий собой готовый препарат, который микроскопируют (при увеличении ×56—80). Если препарат получился плотным, его просветляют 1—2 каплями воды или 50%-ного раствора глицерина. Под микроскопом среди пылевых частиц хорошо видны яйца гельминтов. Микроскопирование препаратов может производиться на обследуемом объекте сразу после отбора проб или в лаборатории.

Сбор проб пыли и воздуха непосредственно на предметное стекло (слайд), покрытое клейкой смазкой, исключает использование фильтров, центрифугирование, приготовление мазков и другие действия, во время которых могут быть потери яиц гельминтов или нарушение их целостности. Кроме того, использование клейких предметных стекол (слайдов) ускоряет время отбора проб и позволяет, что особенно важно при обследовании детских учреждений, просматривать предметные стекла на местах обследования. Последнее дает возможность на местах составлять план мероприятий по предупреждению загрязнения и дегельминтизации внешней среды.

Б.2.2 Исследование пыли и воздуха на яйца гельминтов. Метод Каледина и Романенко (1982)

Для отбора и исследования проб пыли используют липкую прозрачную целлофановую ленту (скотч) со слоем клея до 3 мм.

Ленту шириной 20 мм и длиной 7—8 см приклеивают липким слоем к разным участкам исследуемой поверхности 6—8 раз, в зависимости от запыленности объекта, а затем ее помещают на предметное стекло (слайд). Липкой лентой нельзя делать отбор проб пыли с бумажных поверхностей (книги), мягких игрушек и очень загрязненных предметов (половики, коврики).

При проведении исследования ленту отклеивают на участках микроскопирования и вносят под нее несколько капель касторового или вазелинового масла (для устранения пузырьков воздуха), исследуют при малом увеличении микроскопа. Препарат может храниться несколько дней.

Приложение В
(обязательное)

Расчет достоверности различий средних значений количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой средах по Стьюденту-Фишеру

Достоверность различия средних значений количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой средах/мембранных фильтрах, оценивают с использованием критерия Стьюдента для вероятности 95 %.

Для определения достоверности различия средних величин двух вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента сначала рассчитывают дисперсию для каждого сравниваемого ряда значений, далее вычисляется критерий Стьюдента (t).

В.1 Определение дисперсии

Дисперсию (σ^2) вычисляют по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum(x_n - M)^2}{N-1}, \quad \text{(В.1)}$$

где $\sum$ — знак суммирования;
x_n — варианты количества колоний на чашках (фильтрах) на данной среде;
M — среднее арифметическое значение количества выросших колоний;
N — количество посевов в исследовании, выполненных на данной среде.

В.2 Расчет значения критерия Стьюдента

Критерий Стьюдента t вычисляется по формуле:

$$|t| = (M_1 - M_2)\sqrt{\frac{1-2(N_1+N_2)^{-1}}{\frac{\sigma_1^2}{N_2}+\frac{\sigma_2^2}{N_1}}}, \quad \text{(В.2)}$$

где M_1 и M_2 — сравниваемые средние арифметические значения количества колоний;
σ_1 и σ_2 — дисперсии сравниваемых рядов посевов;
N_1 и N_2 — количество посевов в исследуемых вариационных рядах.

Для оценки достоверности различия средних величин полученное значение критерия сравнивается с табличным значением, для числа степеней свободы $n = N_1 + N_2 - 2$ и вероятности 95 %. Значения t_p по Стьюденту-Фишеру приведены в таблице В.1. Знак критерия не принимается во внимание.

Если полученное значение критерия больше табличного, то различие между сравниваемыми средними величинами достоверно.

Таблица В.1 — Значения t_p (по Стьюденту-Фишеру)

Число степеней вероятности свободы n	Требуемый уровень доверительного интервала средней p	
	0,95	0,99
1	12,71	63,66
2	4,3	9,92
3	3,18	5,84
4	2,78	4,6
5	2,57	4,03
6	2,45	3,71
7	2,36	3,5
8	2,31	3,36
9	2,26	3,25

Окончание таблицы В.1

Число степеней вероятности свободы n	Требуемый уровень доверительного интервала средней p	
	0,95	0,99
10	2,23	3,17
11	2,2	3,11
12	2,18	3,06
13	2,16	3,01
14	2,14	2,98
15	2,13	2,95
16	2,12	2,92
17	2,11	2,9
18	2,1	2,88
19	2,09	2,86
20	2,09	2,84
21	2,08	2,83
22	2,07	2,82
23	2,07	2,81
24	2,06	2,8
25	2,06	2,79
26	2,06	2,78
27	2,05	2,77
28	2,05	2,76
29	2,04	2,76
30	2,04	2,75
40	2,02	2,7
60	2	2,66
120	1,98	2,62
бесконечность	1,96	2,58

Оценку неопределенности измерений проводят в соответствии с ГОСТ Р ИСО 21748.

Библиография

[1] СанПиН 3.3686—21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

[2] Р 3.5.1904—04 Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях

[3] СанПиН 1.2.3685—21 Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания

УДК 543.63:544:632:006.354 ОКС 13.060.70

Ключевые слова: качество воды, вода питьевая, внутрилабораторный контроль, микробиологическая лаборатория, паразитологическая лаборатория, обсемененность, стерильность, дистиллированная вода, питательные среды, тест-микроорганизмы, криопротекторы, лиофилизация культур, криозаморозка

Редактор *Д.А. Кожемяк*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 14.04.2022. Подписано в печать 28.06.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 6,51. Уч.-изд. л. 5,89.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru