Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах

Методические рекомендации
МР 4.2.0161—19

Издание официальное

Москва • 2020

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах

Методические рекомендации
МР 4.2.0161—19

ББК 51.20
М41

М41 **Методы** индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах: Методические рекомендации.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.—20 с.

ISBN 978–5–7508–1727–6

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. П. Игонина, Ю. Е. Абрамов), ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян, Н. Г. Седых), ФБУН НИИДезинфектологии Роспотребнадзора (Н. В. Шестопалов, Л. С. Федорова), ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН (О. А. Кузнецова, Ю. К. Юшина, Д. С. Батаева, Е. В. Зайко), ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (А. Л. Гинзбург, Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, Н. И. Филиппова).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 23 декабря 2019 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.20

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 12.03.2020

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,25

Тираж 100 экз. Заказ 10

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19А

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59

© Роспотребнадзор, 2020

Содержание

I. Общие положения и область применения 4
II. Методы и этапы индикации биологических плёнок 7
III. Порядок отбора проб смывов 9
IV. Порядок исследования проб смывов 11
Приложение 1. Оборудование, расходные материалы, питательные среды, реагенты и реактивы 12
Приложение 2. Ориентировочный список потенциальных мест отбора проб 17
Библиографические ссылки 19

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

23 декабря 2019 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах

Методические рекомендации МР 4.2.0161—19

I. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее – МР) определяют методы санитарно-бактериологических исследований по идентификации бактерий, в том числе в состоянии биологических плёнок, на абиотических поверхностях в медицинских организациях и на предприятиях по производству пищевой продукции.

1.2. Биологические плёнки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов. На сегодняшний день достоверно установлена роль биоплёнок при большинстве случаев всех хронических и/или рецидивирующих инфекций. Биоплёнки с высокой устойчивостью к антибиотикам и другим противомикробным препаратам являются причиной более 65 % случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП, HAIs), которые, по данным зарубежных центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC и ECDC, соответственно), ежегодно поражают более 6 миллионов человек. Биоплёнки участвуют в развитии 80 % всех микробных инфекций в организме, в том числе связанных с медицинскими устройствами, такими как катетеры, эндотрахеальные трубки, протезы суставов и клапанов сердца. Биоплёнки значительно задерживают заживление ран и снижают эффективность антимикробной терапии инфицированных кожных ран, участвуют в развитии инфекций среднего уха, кариеса, гингивита, простатита и т. д.

В окружающей среде бактерии обнаруживаются в двух формах существования:

– свободное движение или планктонное состояние;

– состояние прикрепления к какой-либо поверхности, при котором они образуют микробные ассоциации, сообщества или так называемые биологические плёнки (биоплёнки, biofilms).

Большинство популяций бактерий (более 95 %) существует в прикрепленном состоянии и образуют биопленки на различных поверхностях, как биотических, так и абиотических, в природе и в организме различных хозяев.

Выделяют пять стадий развития биоплёнки:

– первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, адсорбция) из окружающей среды (обычно жидкости, стадия обратима);

– окончательное (необратимое) прикрепление (фиксация, на этой стадии бактерии выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную адгезию);

– созревание – клетки, прикрепившиеся к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток, внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию (на этой стадии накапливаются питательные вещества, клетки начинают делиться);

– рост – на этой стадии образована зрелая биоплёнка, которая изменяет свой размер и форму (внеклеточный матрикс служит защитой клеток от внешних угроз);

– дисперсия (распространение бактерий, на этой стадии в результате деления периодически от биопленки отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию).

Планктонные бактерии присоединяются друг к другу и к поверхностям в течение нескольких минут. Соединенные микроколонии образуются в течение 2—4 часов. В течение 6—12 часов клетки вырабатывают внеклеточные полисахариды, и биоплёнка становится толерантной к антибактериальным средствам. Зрелые биоплёнки, резистентные к биоцидам, образуются в течение 24—48—72 часов, в зависимости от видов бактерий и условий роста. Биоплёнки быстро восстанавливаются после механического разрушения и вновь формируют зрелую форму в течение 8—12—24 часов. Дисперсия планктонных клеток из зрелых биоплёнок происходит по достижении максимальной зрелости микроколоний (более 72 часов).

Биологические плёнки способствуют формированию устойчивости бактерий к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая воздействие антибактериальных препаратов, образуя экзополисахаридный

матрикс (далее – ЭПМ), обладающий защитными (протективными) функциями. При наличии биопленок на поверхностях возможно получение ложноотрицательных результатов при проведении санитарно-бактериологических исследований (смывов), т. к. зрелый ЭМП препятствует механическому переносу бактерий на диагностические питательные среды. Разрушение ЭПМ позволяет проводить высокоэффективные смывы, исключая вероятность ложноотрицательного результата.

1.3. МР *предназначены для специалистов органов и организаций*, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, проводящих санитарно-эпидемиологические экспертизы, исследования и иные виды оценок, а также для аккредитованных лабораторий, проводящих отбор проб, исследования и контроль за санитарно-гигиеническим состоянием и микробиологическими показателями в медицинских организациях и на предприятиях по производству пищевой продукции.

1.4. Объектами санитарно-бактериологических исследований являются поверхности объектов окружающей среды медицинских организаций (в операционных блоках, хирургических, послеоперационных палатах и отделениях, палатах и отделениях реанимации и интенсивной терапии, перевязочных и процедурных кабинетах и других подразделениях) и изделия медицинского назначения (включая эндоскопическое оборудование, зонды, катетеры, бужи и прочее), а также объекты производственной среды пищевых производств (смывы с технологического оборудования, тары, инвентаря, стен, полов, одежды и т. д.).

1.5. При проведении исследований используются питательные среды, расходные материалы и средства, перечисленные в приложении 1 к настоящим МР, либо аналогичные или с лучшими характеристиками.

1.6. В медицинских организациях бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов окружающей среды осуществляется в соответствии с методическими указаниями[1].

1.7. На предприятиях по производству пищевой продукции перечень микроорганизмов, подлежащих контролю (общее количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), стафилококки, бактерии группы кишечных палочек, клостридии, бактерии родов *Salmonella*, *Proteus*, *Listeria*, *Campylobacter* и др.), определяется в соответствии со стандартами[2].

---

[1] Пункт 3.2.1 МУК 4.2.2942—11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях» (далее – МУК 4.2.2942—11).

[2] ГОСТ 31746; ГОСТ 31747; ГОСТ 10444.15; ГОСТ 31659; ГОСТ 28560; ГОСТ 29185; ГОСТ 32031; ГОСТ ISO 10272-1.

II. Методы и этапы индикации биологических плёнок

2.1. К методам и этапам индикации биологических плёнок относятся:

– визуальная индикация мест локализации биоплёнок с помощью каталазного экспресс-теста (первый этап);

Примечание. Каталазный экспресс-тест применяется для экспресс-индикации мест возможного биологического загрязнения, в том числе для определения мест последующего применения ферментного теста.

– визуальная индикация мест локализации биоплёнок с помощью флуорохромных красителей и дальнейшей визуализации их при помощи специального освещения (второй этап);

Примечание. Флуорохромный экспересс-тест является вспомогательным и не обязательным для исполнения. Данный экспресс-тест может применяться, в том числе, для проверки качества текущих и генеральных уборок.

– разрушение экзополисахаридного матрикса биоплёнки специальными ферментными индикаторами с последующим отбором и микробиологическим исследованием проб смывов (третий этап).

Примечание. Ферментный тест является базовым для обнаружения бактерий в состоянии биоплёнки.

Этапность и очередность тестов не является обязательной. Тесты применяются в зависимости от конкретных поставленных задач.

2.2. Каталазный экспресс-тест обнаружения бактериальной контаминации абиотических поверхностей, в том числе в состоянии биоплёнок, основан на реакции индикатора на основе пероксида водорода с каталазой – ферментом системы антиоксидантной защиты бактериальной клетки.

Реакция основана на ферментативном разрушении перекиси водорода до кислорода и воды.

Наличие незначительного количества каталазонегативных штаммов бактерий не влияет на чистоту проведения каталазного экспресс-теста, поскольку биоплёнка, как правило, имеет поливидовой состав.

Чувствительность каталазного экспресс-теста, при условии соблюдения всех рецептурных характеристик индикатора, – от 10^4 кл./мл бактерий.

Каталазный индикатор (в соответствии с п. 8 приложения 1) наносят на очищенную и продезинфицированную исследуемую поверхность, не допуская взбалтывания, в соответствии с инструкцией производителя (порядка 2,0—3,0 мл на 5 $см^2$ поверхности) распылением с расстояния от 10 до 15 см.

При положительной реакции в течение 5—30 секунд после нанесения индикатора начинается процесс барботирования (образования мик-

ропузырьков при реакции выделения кислорода), что является подтверждением наличия каталазоположительных форм бактерий, в том числе в состоянии биологической плёнки, на исследуемой поверхности.

Примечание. При проведении исследования на эндоскопах индикатор не должен быть густым, раствор индикатора должен свободно проникать в каналы эндоскопа.

При исследовании эндоскопа дистальный подвижный конец опускается в раствор индикатора, а в исследуемый инструментальный канал эндоскопа индикатор заливается принудительно, в объеме, достаточном для возникновения реакции (обычно 150—200 мл на эндоскоп).

2.3. Экспресс-тест с флуорохромным красителем применяется для обнаружения структур ЭПМ биологических пленок методом окрашивания их флуорохромным красителем (в виде раствора на основе флуорохромного красителя Нильский красный (Nill red) согласно пункту 9 приложения 1) и дальнейшей визуализации при помощи специального освещения.

Индикатор избирательно связывается с липидами и липополисахаридами ЭПМ биологических плёнок грамположительных и грамотрицательных бактерий. Детекция ЭПМ биологических плёнок проводится методом визуализации свечения флуорохромного красителя, после отмыва водой, в темноте, в проходящем зелёном свете. Визуализация производится в специальных очках красно-оранжевого фильтра.

Степень свечения зависит от зрелости матрикса биоплёнки и от количества липидов и липополисахаридов ЭПМ.

Примечание. Данный экспресс-тест не применяется для индикации биопленок на поверхности и в каналах эндоскопов.

Флуорохромный индикатор наносится на обрабатываемую поверхность в количестве 3—5 мл распылением с расстояния от 10 до 15 см.

Через 5—10 секунд после нанесения индикатора обработанную поверхность промывают дистиллированной водой, без применения механических методов обработки поверхности.

Положительная реакция визуализируется в специальных защитных очках с красно-оранжевым фильтром согласно ГОСТ Р 12.4.230.1 (ЕН 166) в проходящем зеленом свете фонарика.

Отрицательная реакция заключается в отсутствии свечения (или флуоресценции) красителя, что указывает на отсутствие загрязнения на исследуемых поверхностях.

Примечание. Индикатор необходимо наносить только на очищенные и продезинфицированные поверхности.

2.4. Ферментный тест, включающий применение ферментных индикаторов перед проведением бактериологических смывов, позволяет

провести разрушение структур ЭПМ, в результате чего бактериальные клетки освобождаются от защитного барьера и могут быть уничтожены, удалены или идентифицированы в ходе последующих процедур.

Ферментный индикатор согласно пункту 10 приложения 1 представляет собой стерильный раствор, основным действующим веществом которого является смесь специальных энзимов из группы карбогидраз в рабочем растворе, содержащем функциональные и технологические компоненты, увеличивающие эффективность раствора и обладающие бактерицидным, фунгицидным и бактерицидным действием (катионные ПАВ, растворители и стабилизаторы активности).

Ферментный индикатор применяют методом протирания или локального распыления на поверхности перед проведением отбора проб смывов. Метод распыления применяют при обработке небольших по площади или труднодоступных поверхностей. Индикатор в виде раствора или в виде пены (при наличии специальной насадки на триггере-распылителе) наносится на поверхности в достаточном количестве (порядка 5 мл на 10 $см^2$) с расстояния 10—15 см. После нанесения индикатора на поверхность время экспозиции составляет 10 минут.

При обработке эндоскопов ферментный индикатор наносится на места смывов с поверхностей или вносится в каналы эндоскопа в количестве не менее 150 мл. Время экспозиции после обработки ферментным индикатором составляет 10 минут.

2.5. Отбор проб для проведения микробиологических исследований осуществляют методом смывов с чистых поверхностей различных объектов и проводят после обязательного проведения процедур, указанных в пункте 2.4. Рекомендуется предварительно определить места проведения ферментного теста и отбора проб смывов путем применения каталазного теста в соответствии с пунктом 2.2. После отбора проб поверхности (объекты) подвергают промывке водопроводной водой либо обработке в соответствии с требованиями, установленными для конкретных изделий (в частности, для медицинских изделий – предстерилизационной очистке, дезинфекции высокого уровня или стерилизации).

III. Порядок отбора проб смывов

3.1. Отбор проб смывов с объектов больничной среды и производственной среды предприятий по производству пищевой продукции осуществляется при следующих условиях:

– при отборе смывов с поверхности необходимо использовать тампон (губку, ткань, салфетку), увлажненный нейтрализатором ферментного индикатора (пункт 11 приложения 1 к настоящим МР) и/или нейтрализатором соответствующего дезинфицирующего средства в случае

отбора смывов после дезинфекции, либо пептонной водой (пункт 1 приложения 1 к настоящим МР) – в остальных случаях;

– смывы с площади меньше или равной 10 × 10 см (100 $см^2$) отбирают стерильным тампоном с хлопком или синтетическим материалом;

– при отборе смывов с площади более 100 $см^2$ следует использовать губку, ткань, салфетку;

– смывы с мелких объектов (поверхность которых менее 100 $см^2$) берут со всей поверхности;

– если при взятии смывов с ровной поверхности используются металлические рамки-трафареты, ограничивающие площадь взятия смывов, то такие рамки-трафареты должны быть стерильными;

– смывы с перчаток берут только с наружной стороны ладонной поверхности перчатки;

– смывы с санитарной одежды отбирают с помощью тампонов с четырех участков, каждый из которых должен быть не менее 25 $см^2$, а именно нижняя часть каждого рукава и две площадки с верхней и средней частей передних пол одежды;

– для отбора проб с труднодоступных небольших участков рекомендуется использовать тампоны.

3.2. При определении объектов, которые подлежат санитарно-бактериологическим исследованиям на выявление биоплёнок, основное внимание необходимо уделять объектам, которые имеют постоянный и периодический контакт с жидкостями и органическими веществами, которые могут быть использованы бактериями в качестве питательных веществ.

Труднодоступные места, такие как отверстия или щели в волокнистом, пористом, трудно моющемся оборудовании, пустотелые материалы, являются потенциальными участками для отбора проб на наличие биоплёнок. Для отбора проб в труднодоступных и недоступных местах необходима разборка оборудования. Выбор места отбора проб должен определяться в соответствии с поэтапной проверкой технологической цепи (процесса).

3.3. Ориентировочные места отбора проб в медицинских организациях и на предприятиях по производству пищевой продукции указаны в приложении 2 к настоящим МР.

3.4. Санитарно-бактериологические исследования по обнаружению биоплёнок на абиотических поверхностях в медицинских организациях необходимо проводить:

– в порядке, определенном программой производственного контроля организации, в том числе в эндоскопических отделениях и кабинетах (включая поверхности и каналы эндоскопов);

– по эпидемиологическим показаниям;

– при оценке чувствительности госпитальной микрофлоры к дезинфицирующим средствам в соответствии с методическими указаниями[3].

3.5. Санитарно-бактериологические исследования по обнаружению биоплёнок на абиотических поверхностях на предприятиях по производству пищевой продукции необходимо проводить в порядке, определенном программой производственного контроля организации (после проведения генеральных уборок), и по эпидемиологическим показаниям.

IV. Порядок исследования проб смывов

4.1. Для обнаружения стафилококков делают посев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл 6,5 % солевого бульона. Засеянные культурой пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч, после чего делают посев на желточно-солевые среды или другие питательные среды, разрешенные к применению в установленном порядке.

4.2. Для обнаружения бактерий группы кишечных палочек делают посев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл среды Кесслера по пункту 17 приложения 1 к настоящим МР. После посева пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч и делают пересев на среду Эндо по пункту 2.21 приложения 1 к настоящим МР. Колонии, выросшие на среде Эндо, подвергают дальнейшему изучению для установления их возможной принадлежности к патогенным энтеробактериям.

4.3. Для обнаружения сальмонелл делают посев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл одной из сред обогащения (магниевая, селенитовая или среда Раппопорта – Вассилиадиса). Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение 18—20 ч, делают пересев на среду Эндо (по пункту 21 приложения 1 к настоящим МР) и агар висмут-сульфитный (по пункту 18 приложения 1 к настоящим МР) с последующим отбором подозрительных колоний и их идентификацией.

4.4. Для обнаружения синегнойной палочки делают посев на среду № 8 по пункту 19 приложения 1 к настоящим МР (бульон для накопления стафилококков и синегнойной палочки) и среду № 9 по пункту 20 приложения 1 к настоящим МР (для определения синегнойной палочки по наличию пигмента пиоцианина) или другие питательные среды, разрешенные к применению в установленном порядке.

[3] МУ 3.5.1.3439—17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях».

Приложение 1

Оборудование, расходные материалы, питательные среды, реагенты и реактивы

1. **Пептонная вода (0,1 %)**

Состав (г/л):

Пептон бактериологический	1,00
Калия нитрат	1,00
Натрия бикарбонат	2,00

pH 7,4 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) 15 мин.

2. **Мясной солевой бульон**

Состав (г/л):

Пептический перевар животной ткани	10,00
Мясной экстракт	10,00
Ткань бычьего сердца нейтральная	30,00
Натрия хлорид	100,00

Конечное значение pH (при 25 °С) 7,6 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм (121 °С) в течение 15 мин.

3. **Элективно-солевой агар**

Состав (г/л):

Пептон ферментативный сухой	5,00
Гидролизат рыбный ферментативный	5,00
Триптон (гидролизат казеина ферментативный)	3,00
Экстракт автолизированных дрожжей осветленный	1,40
Натрий хлористый	85,00
Агар микробиологический	11,00
Натрий углекислый	0,30
Натрий фосфорнокислый двузамещённый безводный	0,30

Конечное значение pH 7,2 ± 0,2.

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин.

4. **Стафилококковый агар № 110**

Состав (г/л):

Гидролизат казеина	10,00
Дрожжевой экстракт	2,50
Желатин	30,00

Лактоза	2,00
D-Маннит	10,00
Натрия хлорид	75,00
Калия гидрофосфат	5,00
Натрия азид	–
Агар-агар	15,00

Конечное значение pH (при 25 °С) 7,0 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин.

Примечание. Азид натрия имеет тенденцию к образованию взрывчатых соединений с металлами, поэтому рекомендуется использовать большое количество воды для удаления остатков среды.

5. **Маннитол солевой агар**

Состав (г/л):

Протеозопептон	10,00
Мясной экстракт	1,00
Натрия хлорид	75,00
D-маннит	10,00
Феноловый красный	0,025
Агар-агар	15,00

Конечное значение pH (при 25 °С) 7,4 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин.

6. **Агар Бэйд-Паркер**

Состав (г/л):

Гидролизат казеина	10,00
Мясной экстракт	5,00
Дрожжевой экстракт	1,00
Глицин	12,00
Натрия пируват	10,00
Лития хлорид	5,00
Агар-агар	20,00

Конечное значение pH (при 25 °С) 7,0 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин.

Примечание. Хлорид лития ядовит. Необходимо избегать контакта с ним и вдыхания его паров. В случае попадания хлорида лития на кожу немедленно промыть большим количеством воды.

7. **Среда Раппопорта – Вассилиадиса**

Состав (г/л):

Папаиновый перевар соевой муки	5,00

Натрия хлорид	8,00
Калия дигидрофосфат	1,60
Магния хлорид (× 6 H_2O)	40,00
Малахитовый зеленый	0,04

Конечное значение pH (при 25 °C) 5,2 ± 0,2

Стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм. (115 °C) в течение 15 мин.

8. **Каталазный индикатор**

Индикатор содержит в качестве основного действующего вещества пероксид водорода (3 %), функциональные компоненты (увеличивающие чувствительность индикатора – N-Кокоалкил-N,N-диметиламиноксид) и технологические компоненты (загустители, растворители).

9. **Флуорохромный индикатор**

Раствор флуорохромного красителя Нильский красный (Nill red). Для реакции используется раствор в концентрации 5-10μM. Для приготовления базового стокового 100-кратного раствора используется диметилсульфоксид (ДМСО), индикатор (рабочий раствор) готовят на физиологическом растворе.

10. **Ферментный индикатор**

Состав ферментного индикатора:

Водный раствор смеси энзимов из группы карбогидраз (1,6-α-D-глюкан-6-глюкано-гидралаза и 1,4-(1,3:1,4)-β-D-глюкан-4-глюкано-гидролаза) – 0,5—1,0 %. Функциональный (микробиоцидный) компонент: смесь N-Кокоалкил-N,N-диметиламиноксида, дидецилдиметиламмониум хлорида, бензалкониум хлорида и N,N-бис(3-аминопропил)додециламин (не менее 0,04 % по сумме действующих веществ).

Для проведения качественных процедур в практических исследованиях необходимо использовать ферменты с подтвержденной активностью:

– активность по 1,6-α-D-глюкан-6-глюкано-гидралазы – не менее 10 000 ед/г.;

– сопутствующая активность по 1,4-(1,3:1,4)-β-D-глюкан-4-глюкано-гидролазе не менее 20 ед./г;

– содержание белка (по Лоури) не менее 25 мг/г.

В реакции используется стерильный раствор промышленного изготовления.

11. **Нейтрализатор для ферментного индикатора**

Для нейтрализации действующего вещества индикатора, которое может быть перенесено с материалом тест-объекта при его посеве в питательную среду, используют нейтрализатор – вещество, которое устра-

няет (нейтрализует) действие химического агента на микробную клетку, но не убивает и не задерживает рост тест-микроорганизма.

После воздействия химического агента поверхности (или объекты) промывают или протирают раствором нейтрализатора либо добавляют его непосредственно в транспортную или питательную среду в концентрации 0,1 %.

Состав нейтрализатора для ферментного индикатора: стерильный 1,0 % водный раствор лаурилсульфата натрия.

12. Питательные среды и реактивы для выявления бактерий рода *Salmonella* готовят в соответствии с ГОСТ 31659.2.12. Питательные среды и реактивы для выявления бактерий вида *L. monocytogenes* готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

13. Питательные среды и реактивы для выявления и определения количества *коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus* готовят в соответствии с ГОСТ 31746.

14. Питательные среды и реактивы для выявления бактерий родов *Proteus, Morganella, Providencia* готовят в соответствии с ГОСТ 28560.

15. Питательные среды и реактивы для выявления и определения количества бактерий группы *кишечных палочек (колиформных бактерий)* готовят в соответствии с ГОСТ 31747.

16. Питательные среды и реактивы для выявления бактерий *Campylobacter spp.* готовят в соответствии с ГОСТ ISO 10272-1.

17. **Среда Кесслера**

Состав (г/л):

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	5,0
Питательный бульон сухой	3,5
Д (+)-лактоза	10,0
Желчь крупного рогатого скота очищенная сухая	4,5
Кристаллический фиолетовый	0,015
Натрий углекислый	0,3 ± 0,15

Стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм. (115 °С) в течение 15 мин.

18. **Агар висмут-сульфитный**

Состав (г/л):

Бактериологический пептон	10,0
Висмут-сульфитный индикатор	8,0
Мясной экстракт	5,0
Декстроза	5,0

Na_2HPO_4	4,0
Сульфат железа	0,3
Бриллиантовый зеленый	0,025
Бактериологический агар	20,0

Конечное значение pH 7,5 ± 0,2 при 25 °С

Стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм. (115 °С) в течение 15 мин.

19. **Среда питательная № 8**

Состав (г/л):

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	20,0
Калий сернокислый	9,0
Натрий азотнокислый	4,0
D-глюкоза	5,0
Экстракт кормовых дрожжей	6,0
Сода кальцинированная	0,4

Стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм. (115 °С) в течение 15 мин.

20. **Питательная среда № 9**

Панкреатический гидролизат казеина	8,0
Панкреатический гидролизат кормовых дрожжей	1,5
Д-глюкоза	0,7
Калий азотнокислый	10,0
Агар микробиологический	9,7 ± 1,0
Натрия хлорид	0,7
Сода кальцинированная	0,5

Стерилизовать автоклавированием (112 ± 2) °С в течение 20 мин.

21. **Среда Эндо**

Состав (г/л):

Бактериологический пептон	10,0
Лактоза	10,0
K_2HPO_4	3,5
Сульфит натрия	2,5
Бактериологический агар	10,0

Конечная величина pH 7,5 ± 0,2 при 25 °С

Примечание. Допускается использование питательных сред, расходных материалов и средств с аналогичными или лучшими характеристиками.

Приложение 2

Ориентировочный список потенциальных мест отбора проб

I. В медицинских организациях

А. Операционный блок:
– интубационная трубка;
– маска наркозного аппарата;
– тройник наркозного аппарата;
– гофрированная трубка;
– ларингоскоп;
– дыхательный мешок;
– емкости и приспособления для мытья и обработки рук;
– фартуки (клеенчатые или полиэтиленовые);
– рабочие столы;
– операционный стол;
– клапан вдоха;
– наружная и внутренние поверхности (каналы) эндоскопов;
– медицинские изделия многократного применения;
– санитарно-техническое оборудование, раковины, смесители раковин, сливные сифоны раковин и душевых и пр.

Б. Хирургические палаты, послеоперационные палаты, отделения, палаты реанимации и интенсивной терапии:
– кровать;
– приспособления для обработки рук персонала;
– запасная наркозная аппаратура (набор реанимационной укладки);
– внутренняя поверхность шкафов и холодильников (для хранения лекарственных средств, термометров);
– медицинские изделия многократного использования;
– санитарно-техническое оборудование, раковины, смесители раковин, сливные сифоны и пр.

В. Перевязочные, процедурные:
– кушетка и приспособления для перевязок;
– приспособления для обработки рук персонала;
– мебель (медицинские столы, тумбочки);
– внутренние и наружные поверхности оборудования для химической стерилизации (моюще-дезинфицирующие машины-репроцессоры для обработки эндоскопов, шкафы, стойки, чехлы для хранения стерильных эндоскопов);
– гибкая часть эндоскопов и оптика;

– наружная и внутренние поверхности (каналы) эндоскопов;

– внутренняя поверхность шкафов и холодильников для хранения лекарственных препаратов и медицинских изделий;

– внутренняя и наружная поверхности бактерицидных камер для хранения стерильных медицинских изделий;

– санитарно-техническое оборудование, раковины, смесители раковин, сливные сифоны и пр.

Г. Стоматологические кабинеты:

– хирургические и терапевтические инструменты, в том числе вращающиеся;

– слюноотсосы, ретракторы, роторасширители, зеркала и т. п.;

– санитарно-техническое оборудование, раковины, смесители раковин, сливные сифоны и пр.;

Д. Палаты терапевтического профиля:

– столы, стулья, тумбочки прикроватные и внутренние поверхности тумбочек;

– резиновые уплотнения в кулерах;

– санитарно-техническое оборудование, раковины, смесители раковин, сливные сифоны и пр.

II. На предприятиях по производству пищевой продукции

Места отбора проб на предприятиях по производству пищевой продукции:

– застойные, труднодоступные для моющих и дезинфицирующих средств зоны (стыковые соединения, сварные швы, узкие каналы, мембранные фильтры, решётки сепараторов, сита и т.д.);

– резьбовые соединения сосудов и резервуаров;

– полы и стены;

– пористые поверхности оборудования и инвентаря: пластиковая тара, корродированный металл;

– объёмные резервуары (малые фиксированные и движущиеся внутренние элементы);

– конвейеры (мелкие элементы (болты, уплотнители), трещины на полотне);

– пробоотборники, краны, клапаны, дренажные каналы;

– шланги, уплотнители, перчатки, резиновые и силиконовые насадки;

– поверхности и края инвентаря, подверженные механическим нагрузкам: лезвие ножей, край пластиковых и металлических совков, разделочные доски, пластиковая и металлическая тара.

Библиографические ссылки

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3. СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

4. СП 3.1.7.2616—10 «Профилактика сальмонеллеза».

5. СП 3.1.7.2817—10 «Профилактика листериоза у людей».

6. СП 3.1.7.2816—10 «Профилактика кампилобактериоза среди людей».

7. СП 2.3.6.1079—01 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям общественного питания, изготовлению и оборотоспособности в них пищевых продуктов и продовольственного сырья».

8. МУК 4.2.2942—11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях».

9. МУ 3.5.1.3439—17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях».

10. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами, утвержденные Минздравом СССР 31.12.1982 № 2657.

11. Порядок санитарно-микробиологического контроля при производстве мяса и мясных продуктов, утвержденный Минсельхозпродом России 15.12.1995.

12. Инструкция о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания, утверждена Госкомсанэпиднадзором России 01.01.1994.

13. ГОСТ 31659 (ISO 6579) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

14. ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий Listeriamonocytogenes».

15. ГОСТ 31746 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазопожительных стафилококков и Staphylococcus aureus».

16. ГОСТ 28560 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia».

17. ГОСТ 31747 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)».

18. ГОСТ ISO 10272-1 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий Campylobacter spp. Часть 1. Метод обнаружения».

19. Тец В.В. Клеточные сообщества. СПб., 1998. 15—73 с. [Tetz V.V. Cell community. Spb. 1998. 15—73 p.]

21. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. 2010 г. Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Р.Р. Азизбекян, Ю.М. Романова. Микробиология, 2010, Т. 79, № 4, с. 435–446.

22. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections // Science. 1999. V. 284. P. 318–322.

23. Pintucci J.P., Corno S., Garotta M. Biofilms and infections of the upper respiratory tract. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010; 14:683-90.

24. Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. Int J Artif Organs 2010; 34:752-8.

25. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284: 318–322.

26. Biofilm life cycle. Montana State University Center for Biofilm Engineering. Available at ULR: gost.e-ecolog.ru

27. George O'Toole, Heidi B. Kaplan and Roberto Kolter. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:49–79.

28. Bester, E. et al. Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates / E. Bester [et al.] Appl. Environ. Microbiol. 2010; 76(4):1189–1197.

gost.e-ecolog.ru