

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



**Санитарно-
микробиологические
исследования факторов
обитания человека**

Зав кафедрой микробиологии КГМУ,
д.м.н. Исаева Гузель Шавхатовна

Введение

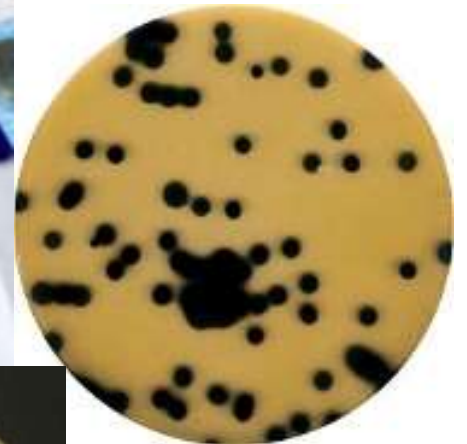
Почва представляет собой главный резервуар, характеризующийся естественной средой обитания различных микроорганизмов. Она благоприятна для развития возбудителей опаснейших бактериальных и вирусных инфекций, а также гельминтозов, микотоксикозов, подкожных микозов и протозойных инфекций. Именно через почву загрязняются объекты окружающей среды, происходит обсеменение патогенными микроорганизмами сырья, пищевых продуктов и кормов



Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМ) почвы

К СПМ почвы относятся бактерии:

- группы кишечных палочек
- группа энтерококков
- споры сульфитредуцирующих клостридий
- потенциально патогенные микроорганизмы





Санитарно-бактериологические показатели почвы и их нормирование

Приоритетными задачами санитарно-микробиологического исследования почвы:

- оценка эколого-биоценотического функционала естественно здоровой почвы, эксплуатация которой происходит в хозяйственных целях;
- характеристика санитарного состояния почвы, используемая в аграрной промышленности;
- охрана от микробного загрязнения почвы водосборных территорий;
- определение доброкачественности различных земельных территорий для озеленения, строительства жилья, водопроводных и рекреационных сооружений, детских площадок и т. п.;
- контроль за функционированием очистных и технологических;
- оценка эффективности различных мероприятий по оздоровлению почвы;
- выявление источников и путей заражения населения
- систематическая оценка сроков выживания в почве патогенных микроорганизмов

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска и в санитарно-защитных зонах по санитарно-бактериологическим показателям, которые делятся на косвенные и прямые:

Косвенные характеризуют интенсивность биологической нагрузки на почву. Это - санитарно-показательные микроорганизмы: бактерии группы кишечной палочки (общие колиформные бактерии) и энтерококки.

Прямые санитарно-бактериологические показатели эпидемической опасности почвы - обнаружение возбудителей кишечных инфекций (патогенные энтеробактерии, энтеровирусы).





Основные показатели оценки санитарного состояния почв территорий населенных мест в зависимости от их функционального назначения

Наименование показателя	Объекты наблюдения. Функциональные зоны, территории:						
	жилая зона	детские дошкольные и школьные учреждения, игровые площадки, территории дворов	ЗСО водных объектов	рекреационные зоны (скверы, парки, бульвары, пляжи, лесопарки)	Транспортные магистрали	промышленная зона	поля, сады и огороды, приусадебные участки, тепличные хозяйства
Лактозоположительные кишечные палочки (колиформы), индекс	+	+	+	+	+	+	+
Энтерококки (фекальные стрептококки), индекс	+	+	+	+	+	+	+
Патогенные микроорганизмы (по эпидпоказаниям), индекс	+	+	+	+	+	+	+
Яйца и личинки гельминтов (жизнеспособных), экземпляров в 1 кг	+	+	+	+	+	+	+
Цисты кишечных патогенных простейших, экземпляров в 100 г	+	+	+	+	+	+	+
Личинки и куколки синантропных мух, экземпляров в почве площади 20 × 20 см	+	+	+	+	-	-	-
Знак "+" - показатель, обязательный при определении санитарного состояния почв знак "-" - показатель необязательный знак "+/-" - показатель, обязательный при наличии источника загрязнения							

СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий"



ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПОЧВЫ

Категория загрязненности почв	Индекс БГКП	Индекс энтерококков	Патогенные бактерии, в т.ч. сальмонеллы	Яйца геогельминтов, экз./кг	Личинки - Л и куколки - К мух, экз. в почве с площадью 20 х 20 см
Чистая	1 - 10	1 - 10	0	0	0
Умеренно опасная	10 - 100	10 - 100	0	до 10	Л - до 10 К - отс.
Опасная	100 - 1000	100 - 1000	0	до 100	Л - до 100 К - до 10
Чрезвычайно опасная	1000 и выше	1000 и выше	0	> 100	Л > 100 К > 10

СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий"

Отбор проб для бактериологического анализа



Отбор проб для бактериологического анализа

Отбор проб для бактериологического анализа проводится не менее 1 раза в год в местах возможного нахождения людей, животных, в местах загрязнения органическими отходами. При изучении динамики самоочищения почвы отбор проводят в течение первого месяца еженедельно, а затем ежемесячно в течение вегетационного периода до завершения активной фазы самоочищения.

Пробная площадка - часть исследуемой территории, характеризующаяся сходными условиями (рельефом, однородностью структуры почвы и растительного покрова, характером хозяйственного использования).

- Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. На площади 100 кв. м закладывается одна пробная площадка размером 25 м. При неоднородности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа.

Точечная проба - материал, взятый из одного места горизонта или одного слоя почвенного профиля, типичный для данного горизонта или слоя.

- Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта. Выкапывается шурф 0,3 м x 0,3 м и глубиной 0,2 м. Поверхность одной из стенок шурфа очищают стерильным ножом. Затем из этой стенки вырезают почвенный образец, размер которого обусловлен заданной навеской, так, если необходимо отобрать 200 г почвы, размер образца 20 см x 3 см x 3 см, 500 г - 20 см x 5 см x 3 см.
- Точечные пробы отбирают ножом, шпателем или почвенным буром.

Объединенную пробу составляют путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке.

Отбор проб для бактериологического анализа

Для бактериологического анализа с одной пробной площадки составляют 10 объединенных проб. Каждую объединенную пробу составляют из трех точечных проб массой от 200 до 250 г каждая, отобранных послойно с глубины от 0 до 5 см, от 5 см до 20 см.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением правил асептики: отбирают стерильными инструментами, перемешивают на стерильной поверхности, помещая в стерильную тару. Время от отбора проб до начала их исследования не должно превышать 1 суток.

При изучении воздействия пестицидов и др. химических веществ на микрофлору и процессы самоочищения в более глубоких слоях почвы для отбора проб почвы пользуются шурфом глубиной до 1 м. Пробы отбирают из стенки шурфа стерильным инструментом через каждые 10 см.

Для контроля санитарного состояния почв детских дошкольных, школьных и лечебно-профилактических учреждений, игровых площадок и зон отдыха отбор проб проводят не менее 2-х раз в год - весной и осенью. Размер пробной площадки должен быть не более 5 x 5 м.

При контроле санитарного состояния почв территорий детских учреждений и игровых площадок отбор проб проводится отдельно из песочниц и с общей территории с глубины 0 - 10 см.

С каждой песочницы отбирается одна объединенная проба, составленная из 5 точечных проб. При необходимости возможен отбор одной объединенной пробы из всех песочниц каждой возрастной группы, составленной из 8 - 10 точечных проб.

Пробы почвы отбирают либо с игровых территорий каждой группы (одна объединенная из не менее пяти точечных), либо одна объединенная проба с общей территории из 10 точечных, при этом следует учитывать наиболее вероятные места загрязнения почв.

При контроле почв в районе точечных источников загрязнения (выгреба, мусоросборники и т.д.) пробные площадки размером не более 5 x 5 м закладываются на разном расстоянии от источника и в относительно чистом месте (контроль).

При изучении загрязнения почв транспортными магистралями пробные площадки закладываются на придорожных полосах с учетом рельефа местности, растительного покрова, метео- и гидрологических условий.

Пробы почвы отбирают с узких полос длиной 200 - 500 м на расстоянии 0 - 10, 10 - 50, 50 - 100 м от полотна дороги. Одна смешанная проба составляется из 20 - 25 точечных проб, отобранных с глубины 0 - 10 см.

При оценке почв сельскохозяйственных территорий пробы почвы отбирают 2 раза в год (весна, осень) с глубины 0 - 25 см. На каждые 0 - 15 га закладывается не менее 1 площадки размером 100 - 200 кв. м в зависимости от рельефа местности и условий землепользования.

На территории крупных городов с многочисленными источниками загрязнения проводят геохимическое картирование по сети апробирования. Для выявления очагов загрязнения рекомендуется плотность отбора 1 - 5 проб на 1 кв. км с расстоянием между точками отбора 400 - 1000 м. Для дальнейшего выделения территории с максимальной степенью загрязнения сеть апробирования сгущается до 25 - 30 проб на 1 кв. км с расстоянием между точками отбора около 200 м. Пробы отбирают с глубины 0 - 5 см.

Отобранные пробы необходимо пронумеровать и зарегистрировать в журнале, указав следующие данные: порядковый номер и место взятия пробы, рельеф местности, тип почвы, целевое назначение территории, вид загрязнения, дату отбора.

Пробы должны иметь этикетку с указанием места и даты отбора пробы, номера почвенного разреза, почвенной разности, горизонта и глубины взятия пробы, фамилии исследователя.



Подготовка и обработка почвы для анализа

Основными приемами предварительной обработки почвы являются:

- 10-минутное вертикальное встряхивание почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками - при навеске почвы 1г;
- 3-минутная обработка почвенной суспензии первого разведения на мешалке механического диспергатора - при навеске почвы более 1г.

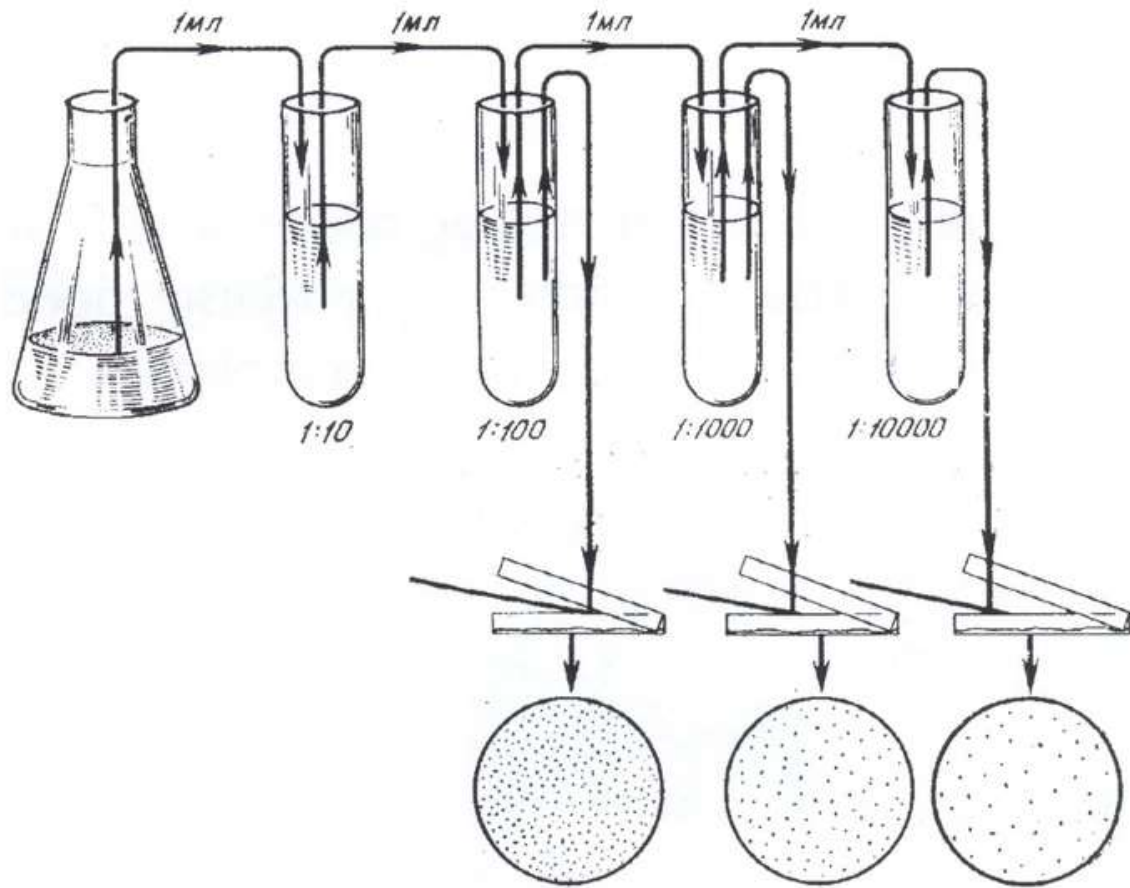


Определение общих колиформных бактерий (БГКП)

Бактерии группы кишечной палочки включают следующие роды: эшерихия, клебсиелла, энтеробактер, цитробактер и серрации.

При анализе почв, для которых предполагается невысокая степень фекального загрязнения, рекомендуется проводить определение титрационным методом. В качестве ускоренного метода для анализа слабозагрязненных почв рекомендуется использовать метод мембранной фильтрации. При анализах проб с предполагаемой высокой степенью фекального загрязнения можно проводить прямой поверхностный посев разведения суспензии на поверхность среды Эндо.

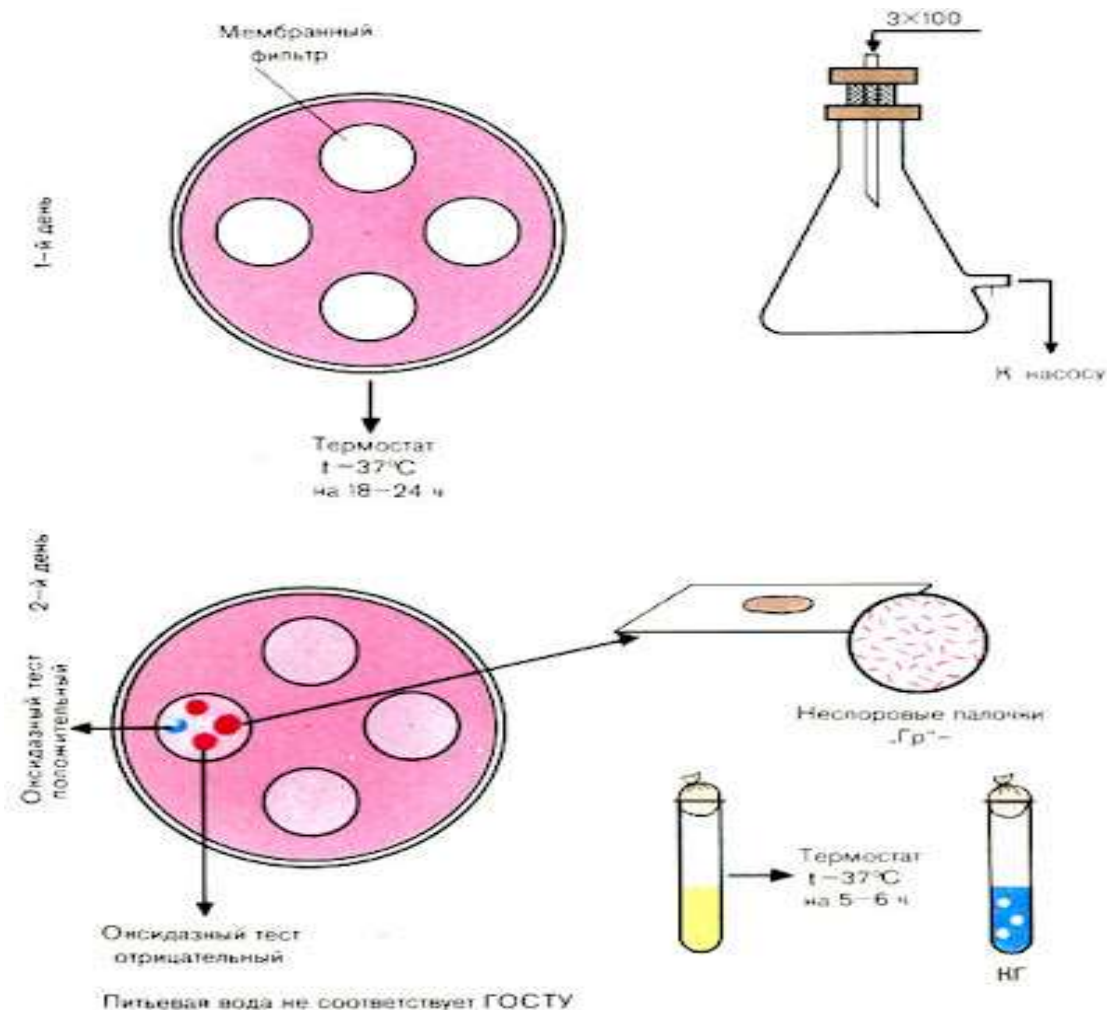
Титрационный метод определения индекса БГКП (колиформ) в почве



- Из первого разведения почвенной суспензии (1:10) стерильной пипеткой берут, засевают во флаконы с лактозо-пептонной среды (ЛПС) или среды Кесслера.
- Посевы инкубируют в течение 48 ч при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, через (24 ± 2) ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. Отсутствие газообразования и помутнения через 48 ч инкубации выдают окончательный отрицательный ответ.
- При наличии в посевах признаков роста: помутнения и газообразования или только помутнения - производится высев на поверхность среды Эндо.

Определение БГКП в почве методом мембранной фильтрации

- В качестве ускоренного метода для обнаружения колиформных бактерий целесообразно использовать метод мембранных фильтров.
- Для микробиологических целей используются фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм и другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества. Метод основан на фильтрации установленного объема - 5,0 - 10,0 куб. см почвенной суспензии первого разведения (1:10) - через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциальной, питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам. Для того чтобы облегчить фильтрование почвенной суспензии через мембранный фильтр, желательно до фильтрования провести предварительную обработку.
- Мембранные фильтры должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями изготовителя.





Определение энтерококков

Титрационный метод

Из порции среды накопления, где отмечены признаки роста, производят высев петлей на одну из плотных сред (МИС - молочно-ингибиторная среда, ЖСТ - желточная среда Турчинского). Если через 24 ч признаки роста отсутствуют, посеvy оставляют еще на сутки. В случае отсутствия роста дают отрицательный ответ.

Через 24 - 48 ч инкубации посевов на молочно-ингибиторной среде при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в качестве положительных результатов отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых с металлическим блеском или сероватых, мелких колоний. Эта среда позволяет дифференцировать виды энтерококков: *E. faecalis* образует аспидно-черные выпуклые колонии с металлическим блеском, *E. faecalis* биовар *liquefaciens* - такие же колонии, окруженные зоной просветления, *E. faecium* биовар *durans* - серые, мелкие, плоские колонии.

Для подтверждения наличия энтерококков делают микроскопию окрашенных по Граму мазков и каталазный тест. После выявления энтерококков устанавливают титр, при этом принимается то предельное разведение почвы, в котором обнаруживаются колиформы. Для перевода титра в индекс необходимо 1000 разделить на число, выражающее титр. Так, при титре 0,01 индекс равен 100, а при титре 0,1 индекс равен 10.



Определение энтерококков

Метод мембранных фильтров

Учет результатов на среде ЖСТ

Учет результатов на среде ЖСТ производят через 24 - 28 часов. Для учета выбирают фильтры, на которых выросло не более 20 - 30 колоний. Подсчитывают характерные для энтерококков колонии: плоские крупные с ровными краями, белые или бледноокрашенные с небольшим кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Последние образованы *E. faecalis*.

Если выросли колонии другого вида - выпуклые белые мелкие или ярко окрашенные, то их принадлежность к энтерококкам можно подтвердить по отсутствию каталазной активности и по характерной морфологии клеток при микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

Вычисление индекса энтерококков

Подсчитанное число колоний энтерококков суммируют и делят на объем, профильтрованный через фильтры, на которых велся подсчет.

Для расчета индекса количество колоний энтерококков суммируют, умножают на 1000 и делят на объем, профильтрованный через фильтры, на которых велся подсчет.



Определение общей численности почвенных микроорганизмов (ОМЧ)

Для более полного учета общей численности сапрофитных микроорганизмов диспергирование и десорбцию клеток с поверхности почвенных частиц рекомендуется проводить следующим способом. Навеску почвы, используемую для приготовления первого разведения, доводят путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния, растирают в течение 5 минут. Затем готовят первое разведение (1:10), т.е. 10(1) почвы на стерильной водопроводной воде, и почвенная суспензия охлаждается при 5 - 7 °С в течение 20 - 30 мин., затем производят раститровку суспензии обычным способом. Из каждого разведения делают посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,2 куб. см на поверхность почвенного агара, разлитого в стерильные чашки Петри, и равномерно шпателем растирают по всей поверхности чашки. Термостатирование засеянных чашек ведут при (28 - 30) °С в течение 72 ч. Учет результата: количество колоний на обеих чашках суммируют, делят на два и умножают на степень разведения. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).



Определение патогенных энтеробактерий родов *Salmonella* и *Shigella* в 1 г почвы

Сущность определения шигелл и сальмонелл заключается в использовании методов накопления патогенных бактерий в средах обогащения с последующим пересевом на плотные селективные и дифференциальные среды с последующим изучением биохимических свойств выделенных культур и их серологическую идентификацию по методике.

Используют не менее двух сред накопления из перечисленных: среду Мюллера Кауфмана, селенитовый бульон, магниевую среду, тетратионатовый бульон. Для сальмонелл используют любые две среды из четырех, для шигелл - селенитовую среду.

Проведение исследования аналогично исследованию на колиформы

Посевы инкубируют при $(37 \pm 1^\circ\text{C})$ в течение 18 - 24 часов, затем из каждого флакона делают высевы бактериологической петлей на чашки с плотными селективными средами: для сальмонелл - на висмут-сульфитный агар, ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар, для шигелл на бактоагар Плоскирева, среду Эндо или ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар. Чашки с посевами инкубируют при температуре $(37 \pm 1^\circ\text{C})$ в течение 18 - 20 часов, а в случае отсутствия роста чашки с посевами оставляют еще на 24 часа в термостате. С каждой чашки снимают подозрительные на сальмонеллы и шигеллы колонии в пробирки с дифференциально-диагностическими средами. Окончательное определение биохимических и серологических свойств, био- и сероваров проводят по действующим МУ 17.04-23/307-84 "Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями".

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды в ЛО

Исследуемые показатели:

- общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха (КОЕ/м³);
- количество колоний *S. aureus* в 1 м³ воздуха (КОЕ/м³);
- количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 м³ воздуха.

Общее микробное число - это число всех микроорганизмов в измеряемой единице. Чем больше микроорганизмов во внешней среде, тем вероятнее загрязнение патогенными микроорганизмами.

Отбор проб

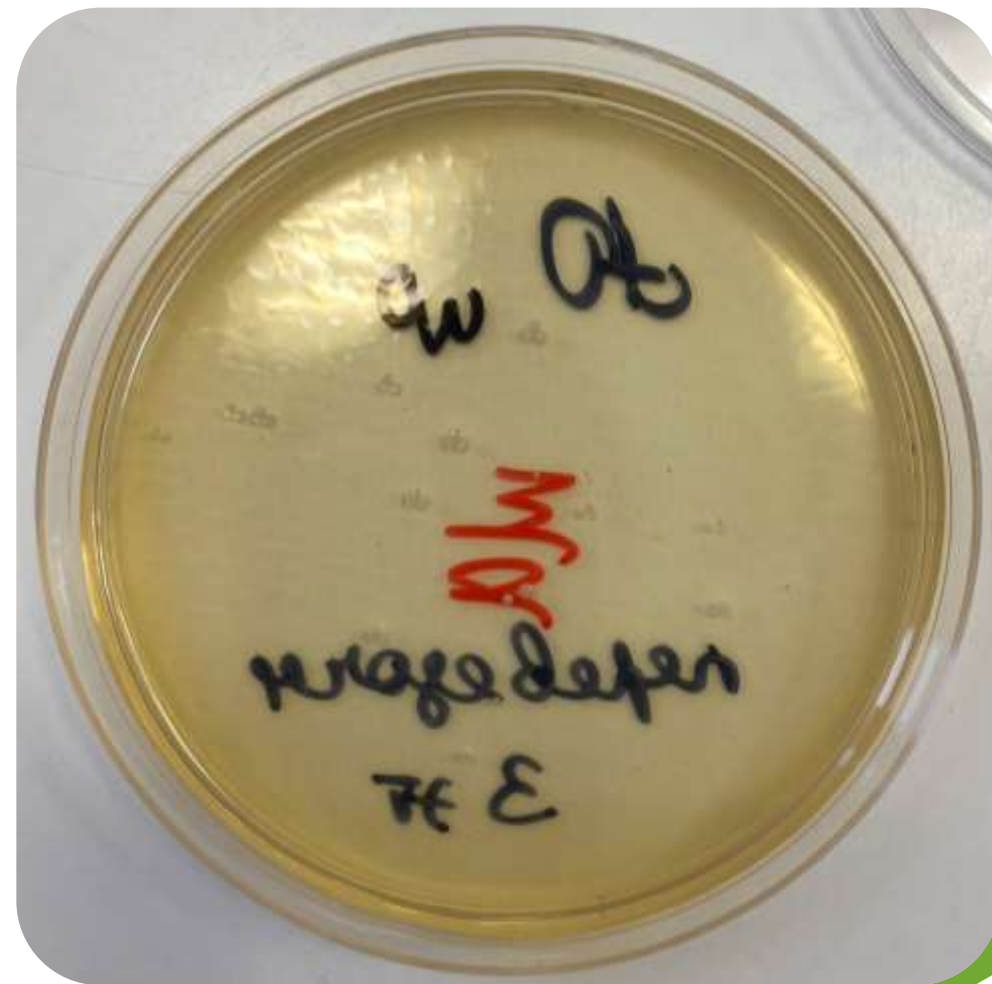
- Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аспиратора (аппарат Кротова, ПУ-1Б). В аппарат помещается открытая чашка Петри со средой, воздух поглощается через щель и распространяется на чашке.
- Количество пропущенного воздуха для определения ОМЧ, дрожжевых и плесневых грибов – 100 дм³
- Для определения *S.aureus* – 250 дм³



Определение ОМЧ, дрожжей и плесени

Забор проб проводят на питательный агар типа МПА, ГРМ-агар и др \Rightarrow инкубация при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в течение (48 ± 2) ч \Rightarrow подсчет количества выросших колоний и пересчет на $1\ \text{м}^3$ воздуха.

При наличии роста колоний дрожжевых и плесневых грибов, их подсчитывают и делают пересчет на $1\ \text{м}^3$ воздуха.



Чашка с МПА для подсчета ОМЧ

Класс чистоты, рекомендуемый воздухообмен, допустимая и расчетная температура

Наименование помещений	Класс чистоты помещений	Санитарно-микробиологические показатели		Допустимая температура воздуха (расчетная)	Рекомендуемый воздухообмен в 1 ч, не менее*		Кратность вытяжки при естественном воздухообмене
		Общее количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха (КОЕ/м ³)			приток	вытяжка	
		до начала работы	во время работы				
1	2	3	4	5	6	7	8
Операционные, послеоперационные палаты, реанимационные залы (палаты), в т. ч. для ожоговых больных, палаты интенсивной терапии, родовые, манипуляционные-туалетные для новорожденных	A	Не более 200	Не более 500	21—24 (21)	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного для асептических помещений 80 % от расчетного воздухообмена, но не менее восьмикратного для септических помещений	80 % от расчетного воздухообмена, но не менее восьмикратного для асептических помещений расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного для септических помещений	Не допускается
Послеродовые палаты, палаты для ожоговых больных, палаты для лечения пациентов в асептических условиях, в т. ч. для иммунокомпрометированных	B	Не более 500	Не более 750	21—23 (22)	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	Не допускается
Послеродовые палаты с совместным пребыванием ребенка, палаты для недоношенных, грудных, травмированных, новорожденных (второй этап выхаживания)	B	Не более 500	Не более 750	23—27 (24)	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	Не допускается
Шлюзы в боксах и полубоксах инфекционных отделений	B	Не нормируется		22-24 (22)	По расчету, но не менее 5-ти кратного обмена		Не допускается

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7	8
Рентгенооперационные, в т. ч. ангиографические	Б	Не более 500	Не более 750	20—26 (20)	12	10	Не допускается
Стерилизационные при операционных ЦСО:	Б	Не более 500	Не более 750	20—27 (20)	3	—	2
— чистая и стерильная зоны (контроля, комплектования и упаковки чистых инструментов, помещения для подготовки перевязочных и операционных материалов и белья, стерилизации, экспедиции)	Б	Не более 500	Не более 750	20—27 (20)	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	80 % от расчетного воздухообмена, но не менее восьмикратного	Не допускается
— грязная зона (приема, разборки, мытья и сушки медицинских инструментов и изделий медицинского назначения)	Г	Не нормируется	Не нормируется	20—27 (20)	80 % от расчетного воздухообмена, но не менее восьмикратного	100 % от расчетного воздухообмена, но не менее десятикратного	Не допускается
Боксы палатных отделений, боксированные палаты	В	Не нормируется	Не нормируется	20—26 (20)	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	2,5
Палатные секции инфекционного отделения, в т. ч. туберкулезные	В	Не нормируется	Не нормируется	20—26 (20)	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	Не допускается
Палаты для взрослых больных, помещения для матерей детских отделений	В	Не нормируется	Не нормируется	20—26 (20)	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	Из расчета 80 м ³ /ч на 1 койку	2
Шлюзы перед палатами для новорожденных	В	Не нормируется	Не нормируется	22—24 (22)	По расчету, но не менее 5	—	Не допускается
Кабинеты врачей, помещения дневного пребывания пациентов, кабинеты функциональной диагностики, процедурные эндоскопии (кроме бронхоскопии)	В	Не нормируется	Не нормируется	20—27 (20)	Из расчета 60 м ³ /ч на 1 человека	Из расчета 60 м ³ /ч на 1 человека	1
Залы лечебной физкультуры	В	Не нормируется	Не нормируется	18—28 (18)	80 % от расчетного воздухообмена (80 м ³ /ч на 1 занимающегося)	100 % от расчетного воздухообмена (80 м ³ /ч на 1 занимающегося)	2

Схема бактериологического исследования на стафилококк

- 1 день. Отбор проб на определение *S. aureus* проводят на желточно-солевые среды \Rightarrow инкубируют в термостате при 37°C (48 ± 2) ч.
- 2-3 день. Стафилококк на желточно-солевых средах растет в виде круглых, блестящих, маслянистых, выпуклых, пигментированных колоний с зоной лецитовителлазной активности \Rightarrow пересев подозрительных колоний на скошенный агар \Rightarrow инкубация в термостате при 37°C на (24 ± 2) ч.
- 4 день. После инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности в реакции плазмокоагуляции (РПК). Дополнительно: ферментация маннита, гемолитическая активность.
- 5 день. Учет результатов дополнительных тестов. Выдача ответа.

Исследование на выделение стафилококка



чашка с ЖСА без лецитовителлазной активности



чашка с ЖСА; колонии *S. aureus* с зоной лецитовителлазной активности

Исследование микробной обсемененности объектов внешней среды в ЛПО

Отбор проб с поверхностей различных объектов проводится методом СМЫВОВ

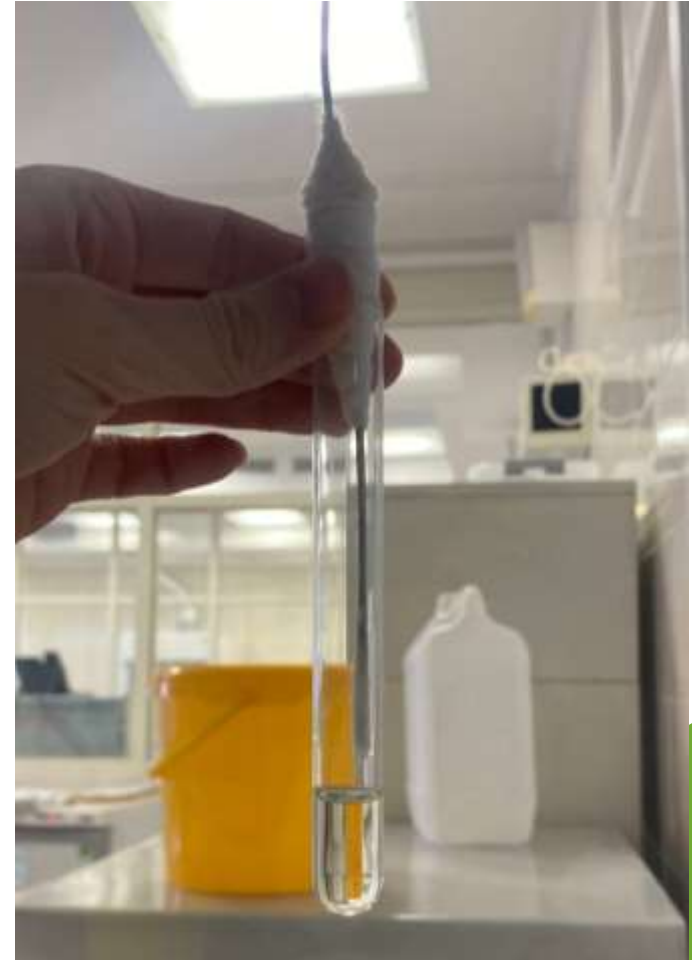
Исследуемые показатели:

1. стафилококки
2. бактерии группы кишечной палочки – БГКП (рода *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*)
3. сальмонеллы
4. синегнойная палочка

По эпидемиологическим показаниям номенклатура исследований микробной обсемененности объектов внешней среды может быть расширена.

Отбор проб

- Взятие смывов производят стерильными ватными тампонами, вмонтированными в пробирки. Для увлажнения тампонов в пробирки наливают по 2 мл 0,1 % пептонной воды
- При контроле мелких предметов смыв забирают с поверхности всего предмета. При контроле предметов с большой поверхностью – смыв проводят в нескольких местах предмета с общей площадью примерно 100 см².



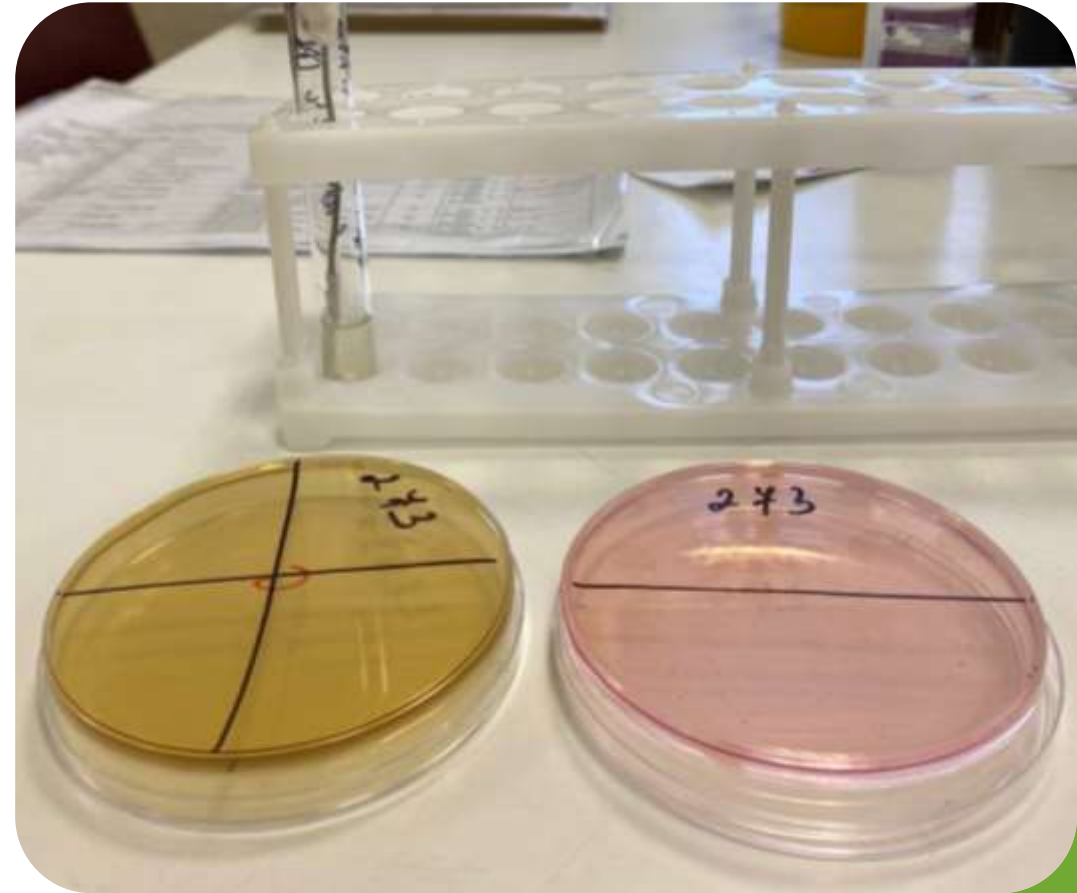
Ориентировочный перечень объектов, подлежащих санитарно-бактериологическому контролю методом СМЫВОВ

ОПЕРАЦИОННЫЙ БЛОК:

- интубационная трубка;
- маска наркозного аппарата;
- тройник наркозного аппарата;
- гофрированная трубка;
- ларингоскоп;
- роторасширитель;
- дыхательный мешок;
- емкости и приспособления для мытья и обработки рук;
- фартуки (клеенчатые или полиэтиленовые);
- рабочие столы;
- шланг вакуум-отсоса, внутренняя часть емкости;
- шланг кислородной подводки;
- клапан вдоха;
- стойки для введения лекарственных средств и вспомогательные приспособления;
- ручка бестеневой лампы;
- руки персонала, участвующего в операции;
- медицинские изделия многократного применения

Определение санитарно-показательных микроорганизмов

- Для выделения стафилококков через 24 ч после отбора проб производят высев смывной жидкости на желточно-солевые среды и далее по схеме
- Для выделения БГКП, сальмонелл, синегнойной палочки высев производится на среду Эндо \Rightarrow инкубация в термостате при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 ± 2) ч \Rightarrow отбор подозрительных колоний и их идентификация



Чашки с ЖСА и Эндо для высева смывной жидкости

Определение БГКП, сальмонелл, синегнойной палочки

- БГКП на среде эндо образуют бордовые колонии с металлическим блеском или без него
- Сальмонеллы - колонии прозрачные или бледно-розового цвета
- Синегнойная палочка – колонии прозрачные или бледно-розового цвета небольших размеров

При обнаружении подозрительных колоний проводится идентификация с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра



рост E.coli на среде Эндо

Определение БГКП

БГКП – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, неспорообразующие палочки, сбраживающие лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа.

При постановке заключения о наличии БГКП необходимо поставить следующие тесты:

1. Окраска по Граму (грам – палочки)
2. Оксидазный тест (оксидаза -)
3. Проверка б/х свойств (среды Гисса с углеводами и поплавком: лактоза +, глюкоза + до кислоты и газа)

Определение синегнойной палочки

Синегнойная палочка – грамотрицательная, неспорообразующая палочка, подвижная, оксидазоположительная, пигментообразующая

При постановке заключения о наличии *P. aeruginosa* необходимо поставить следующие тесты:

1. Окраска по Граму (грам – палочки)
2. Оксидазный тест (оксидаза +)
3. Наличие пигмента (среды «Блеск», ГРМ-агар)

Свидетельствует о санитарном неблагополучии в лечебном учреждении



рост *P. aeruginosa* на ГРМ-агаре

При обнаружении патогенных микроорганизмов

1. Проводится постановка антибиотикочувствительности этих штаммов (в зависимости от выделенного микроорганизма)
2. Изучается чувствительность к дезинфицирующим средствам (орошение растворами Мистраль 3%, Ника-Неодез 2,5% и 3%)
3. Информация передается в эпидемиологический отдел ЛПУ

Per.№	Название выделенного штамма микроорганизма	Источник (объект) и место выделения	Наименование дез.средства	концентрация ДС	экспозиция	способ обработки
927762	Klebsiella pneumoniae	Бронхо-альвеолярный лаваж, ОРИТ-1, ИБ № 21527	Мистраль	3%	30 минут	Орошение
927762	Klebsiella pneumoniae	Бронхо-альвеолярный лаваж, ОРИТ-1, ИБ № 21527	Ника - Неодез	2,5%	60 минут	Орошение
927762	Klebsiella pneumoniae	Бронхо-альвеолярный лаваж, ОРИТ-1, ИБ № 21527	Ника - Неодез	3%	60 минут	Орошение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ					
Per.№	Определяемые показатели	Результаты исследований	Норматив	Единицы измерения	НД на метод исследования
Мистраль 3%					
927762	процент обеззараживания: тест-объект I	100	99,99%	%	СанПин 3.3686-21
Ника - Неодез 2,5%					
927762	процент обеззараживания: тест-объект I	100	99,99%	%	СанПин 3.3686-21
Ника - Неодез 3%					
927762	процент обеззараживания: тест-объект I	100	99,99%	%	СанПин 3.3686-21



Микробиологический контроль качества обработки эндоскопов

- Критерием эффективности полного цикла обработки эндоскопа является отсутствие роста бактерий группы кишечной палочки, золотистого стафилококка, синегнойной палочки, плесневых и дрожжевых грибов, а также других условно-патогенных и патогенных микроорганизмов во всех отобранных пробах. При этом показатель общей микробной обсемененности биопсийного канала эндоскопа должен быть менее 50 КОЕ/мл

Методические указания МУ 3.1.3798-22 *

"Обеспечение эпидемиологической безопасности нестерильных эндоскопических вмешательств на желудочно-кишечном тракте и дыхательных путях"

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СМЫВОВ С ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

- Изучение микрофлоры смывов необходимо в следующих целях:
- Оценка санитарно-гигиенической обстановки в лечебно-профилактических, учебных детских заведениях, на предприятиях общественного питания,
- Исследование бактериологической загрязненности рук персонала, окружающих предметов, оборудования и техники (для этого проводится взятие смывов с оборудования),
- Установление путей распространения различных инфекционных заболеваний,
- Установление эпидемиологической безопасности выпускаемой на предприятии продукции,
- Минимизация рисков отравлений, возникновения различных заболеваний, связанных с приемом или использованием загрязненной продукции и др.



Отбор проб с объектов внешней среды

Отбор проб с поверхностей различных объектов осуществляют методом смывов.

Для контроля микробной обсемененности и эффективности санитарной обработки смывы с объектов окружающей среды проводят до начала работы, либо во время производственного процесса после проведения надлежащей обработки поверхности. В случае необходимости выявления источника обсеменения при установленной микробной контаминации отбор производят с необработанных поверхностей.



ОТБОР ПРОБ

- Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Стерильные ватные тампоны на стеклянных, металлических или деревянных палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками, заготавливают заранее в лаборатории. В день взятия смывов в каждую пробирку с тампоном наливается (в условиях бокса над горелкой) по 5 мл стерильного 0,1 % водного раствора пептона или изотонического раствора хлорида натрия таким образом, чтобы ватный тампон не касался жидкости.
- Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют наклонением пробирки или опусканием тампона в жидкость. В процессе отбора смывов рекомендуется неоднократное смачивание тампонов.





ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ СМЫВОВ

- Из оборудования следует обращать внимание на разделочные доски, мясорубки, производственные столы для готовой пищи, особенно в цехе приготовления холодных закусок.
- Смывы с рук, с санитарной одежды, полотенца берутся в основном у работников, имеющих дело с продукцией, не подвергающейся в дальнейшем тепловой обработке (персонал кухни, холодного цеха, раздатчицы, буфетчицы, официанты, продавцы).
- Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с поверхности в 100 см^2 , для ограничения поверхностей используют шаблон (трафарет), сделанный из проволоки, металлической пластинки. Трафарет имеет площадь 25 см^2 , чтобы взять смывы с площади в 100 см^2 , его накладывают 4 раза в разных местах поверхности контролируемого объекта.



ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ СМЫВОВ

- При взятии смывов с мелких инструментов обтирается вся поверхность предмета, при заборе смывов с тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирают три одноименных объекта - три тарелки, три ложки и т.п. У столовых приборов протирают их рабочую часть.
- При исследовании стаканов протирают внутреннюю поверхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз.
- При взятии смывов с рук протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, затем протирают межпальцевые пространства, ногти и подногтевые пространства.
- При взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 см^2 - нижнюю часть каждого рукава и 2 площадки с верхней и средней частей передних пол спецовки. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25 см^2 .



1. Места отбора на предприятиях общественного питания:

- рабочие поверхности, оборудование, инвентарь; разделочные доски, посуда, руки работающих, холодильные камеры, санитарная одежда и т.д.

2. Места отбора на предприятиях торговли продуктами питания:

- рабочие поверхности, оборудование, инвентарь, разделочные доски, руки работающих, посуда, санитарная одежда и т.д. в производственных и вспомогательных помещениях.

3. Места отбора на предприятиях по производству пищевой продукции:

- рабочие поверхности;

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

- резьбовые соединения сосудов и резервуаров;

- полы и стены и т.д.





Техника взятия смывов

При отборе смывов с поверхности необходимо использовать стерильный тампон, увлажненный стерильной пептонной водой, внесенной в каждую пробирку в количестве не менее 2,0 мл. Тампон увлажняют наклонением пробирки или опусканием тампона в жидкость непосредственно перед взятием смыва.

В случае применения дезинфицирующего агента используется нейтрализатор дезинфицирующих средств.



Рекомендации по взятию смыва:

- смывы с площади меньше или равной 10 x 10 см (100 см²) отбирают стерильным тампоном с хлопком или синтетическим материалом;
- смывы с мелких объектов (поверхность которых менее 100 см²) берут со всей поверхности; при необходимости - с нескольких единиц одноименных предметов (вилки, ножи и т.д.);
- смывы с перчаток берут только с наружной стороны ладонной поверхности перчатки;
- при взятии смывов с рук протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, потом протирают межпальцевые пространства, ногти и подногтевые пространства;
- при взятии смывов с мелких инструментов обтирается вся поверхность предмета, при заборе смывов с тарелок протирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирают три одноименных объекта - три тарелки, три ложки и т.п. У столовых приборов протирают их рабочую часть и т.д.

МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды предусматривает определение бактерий группы кишечных палочек (общих колиформных бактерий, термотолерантных колиформных бактерий), *S. aureus*, общей бактериальной обсемененности (общего микробного числа).



МЕТОДИКА ПОСЕВА СМЫВОВ НА БГКП

- При плановых санитарно-гигиенических обследованиях для выявления БГКП производят посевы смывов на среды Кесслер с лактозой или КОДА, при этом в пробирку со средой опускают тампон и переносят оставшуюся смывную жидкость.
- Посевы на средах Кесслер или КОДА инкубируют при 37 °С, через 18 - 24 часа со среды Кесслер производят высев на плотную дифференциальную среду Эндо, со среды КОДА высев производят только в случае изменения окраски среды или ее помутнения.

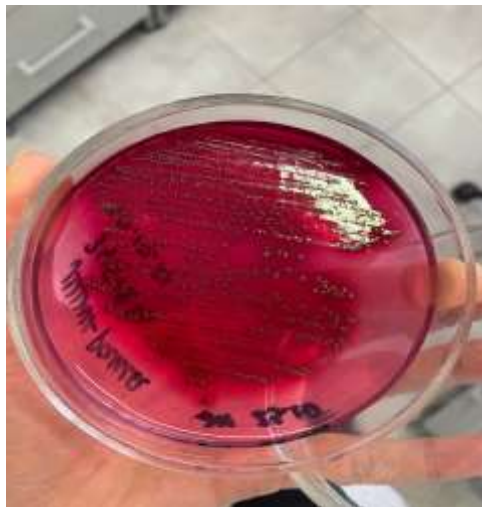


Методика посева смывов на бактерии группы кишечных палочек (общие колиформные бактерии, термотолерантные колиформные бактерии)

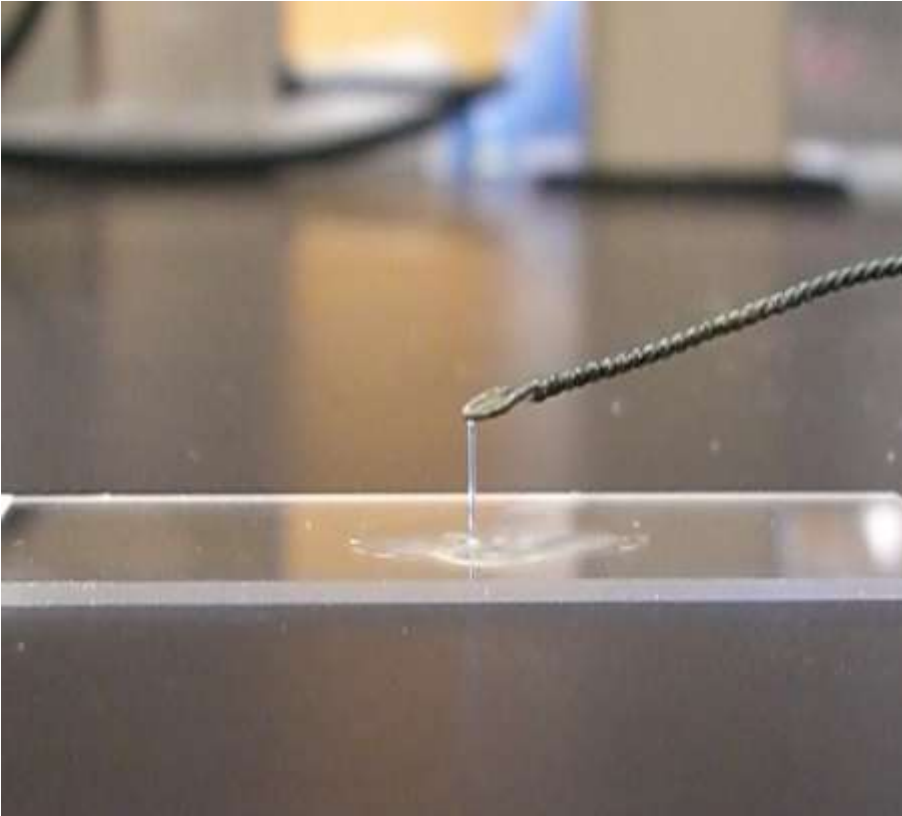


Для выявления бактерий группы кишечных палочек (далее - БГКП) производят посевы смывов на среду Кесслер с поплавком или КОДА, при этом в пробирку со средой опускают тампон и переносят 0,2 - 0,3 см³ смывной жидкости. Посевы на средах Кесслер или КОДА инкубируют при температуре (37) °С в течение 18 - 24 часов. После инкубации из газ-положительных пробирок со среды Кесслер производят высев на плотную дифференциальную среду Эндо, со среды КОДА высев производят только в случае изменения окраски среды или ее помутнения.

Среду Эндо инкубируют при температуре (37) °С в течение 18 - 24 часов. Из колоний, подозрительных или типичных для БГКП, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют либо ставят тест Греггера, выполняют оксидазный тест. В случае обнаружения в препаратах грамотрицательных, не образующих спор палочек дают заключение о том, что в смывах присутствуют БГКП. При отсутствии признаков роста - газообразования или изменения цвета среды - дают заключение об отсутствии в смывах БГКП.



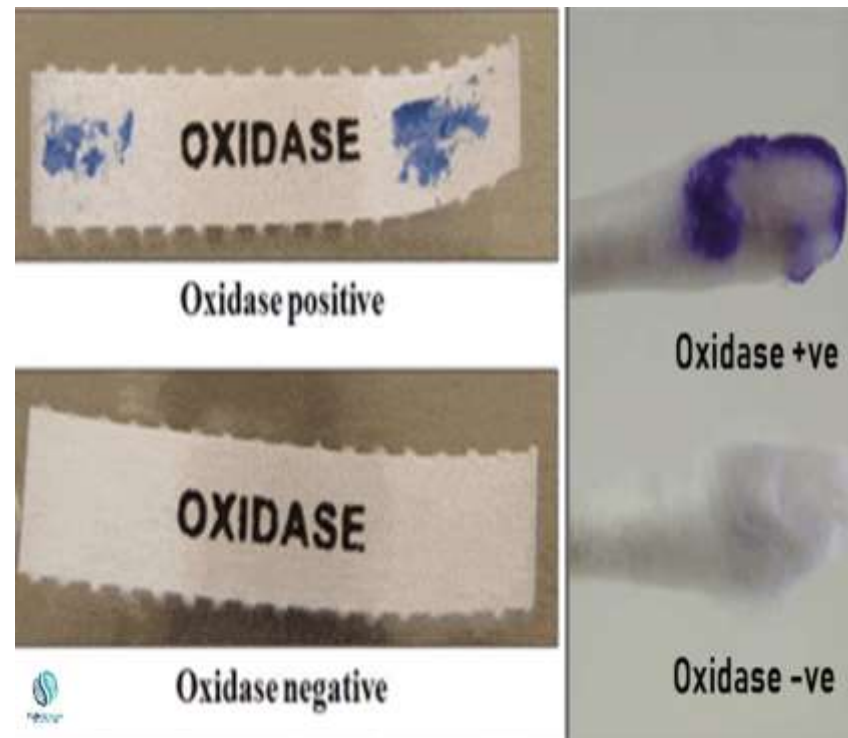
Тест Греггерсена



- В основе этого теста лежит способность клеточных стенок грамположительных бактерий, в отличие от грамотрицательных, сохранять целостность при воздействии на них гидроксида калия (KOH).
- Для постановки этого теста петлю суточной агаровой культуры испытуемого штамма суспендируют на предметном стекле в капле 3% раствора KOH.
- При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, через несколько секунд жидкость в капле приобретает слизистую консистенцию, и при отрыве петли предметного стекла слизистые нити тянутся на 0,5–2,0 см. Учет результатов пробы рекомендуется проводить на темном фоне.
- Приобретение грамотрицательными бактериями слизистой консистенции при обработке их гидроксидом калия связывают с выходом из клеток ДНК, представляющей собой вязкий компонент.

Оксидазный тест

- **Метод 1 (метод Ковача).** На отрезок фильтровальной бумаги наносят несколько капель 1%-ного водного раствора дигидрохлорида тетраметил-*p*-фенилендиамина, приготовленного в тот же день. Выросшую культуру снимают с поверхности агаровой среды платиновой петлей (обычные петли из нихромовой проволоки могут давать ложноположительную реакцию) и наносят ее на увлажненную бумагу. Положительная реакция — появление фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 сек.
- **Метод 2 (метод Эрлиха).** Этот метод менее чувствительный, но более удобный. Несколько капель смеси (1: 1 по объему) 1%-ного раствора α -нафтола, растворенного в 95%-ном этаноле, и свежеприготовленного 1%-ного водного раствора оксалата диметил-и-фенилендиамина наносят на колонии в чашках с агаром. В другом варианте к жидкой культуре добавляют 0,2 мл α -нафтола и 0,3 мл диметилпарафенилендиамина и энергично перемешивают. Положительная реакция: окрашивание колоний или бульонной культуры в фиолетово-синий цвет в течение 10 — 30 сек.
- **Метод 3-использование СИБ-оксидаза.** Культуру, выросшую на поверхности питательного агара для культивирования микроорганизмов в течение 18-24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, растирают платиновой петлей или стеклянной палочкой на индикаторной полоске СИБ, помещенной в чашку Петри. На одной полоске можно исследовать 10-14 культур (не более). Положительная реакция: появление фиолетовой или пурпурной окраски.





Определение ОКБ и ТКБ

- В случае исследования на общие колиформные бактерии (далее - ОКБ) и термотолерантные колиформные бактерии (далее - ТКБ), после взятия смыва тампон помещают на 10 - 15 мин в пробирку с раствором нейтрализатора, затем переносят в пробирку с питательной средой, погружив тампон в пептонную воду или другую допустимую смачивающую среду и инкубируют при температуре $(37)^\circ\text{C}$ в течение 18 - 24 часов. После инкубации проводят высеv на среду Эндо с последующей инкубацией при температуре $(37)^\circ\text{C}$ в течение 18 - 24 часов. При наличии роста на среде Эндо, проводят исследование выросших колоний на оксидазную активность и микроскопию, окрашенного по Граму препарата, или постановку теста Греггера. В случае обнаружения оксидазоотрицательных и грамотрицательных палочек определяют ферментацию лактозы до кислоты и газа. Для подтверждения наличия **ОКБ посев инкубируют при температуре $(37)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов**, для подтверждения наличия **ТКБ посев осуществляют в среду, предварительно прогретую до температуры $(43 - 44)^\circ\text{C}$, и инкубируют при температуре $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 24 часов**. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Методика посева на общую бактериальную обсемененность (общее микробное число).

Для определения общей бактериальной обсемененности (общего микробного числа) поверхностей 1,0 см³ смывной жидкости помещают в чашку Петри и заливают расплавленным питательным агаром. Чашки помещают в термостат при температуре (30 ± 1) °С. Предварительный подсчет выросших колоний производят через 48 часов, окончательный - через 72 часа. Количество колоний, выросших на чашке, умножают на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета.

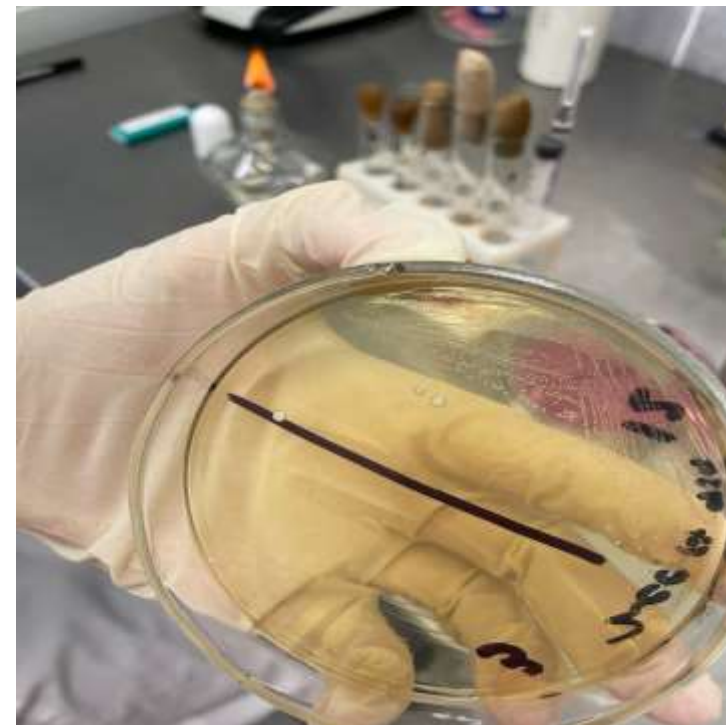


Методика посева на *S. aureus*.

Для выявления *S. aureus* делают высев 0,2 - 0,3 см³ смывной жидкости в пробирку с 5,0 см³ 6,5% солевого бульона. Засеянные пробирки инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18 - 24 часов, после чего делают высев на одну из агаризованных селективно-диагностических сред: молочно-солевой агар (МСА), стафилококкагар, желточно-солевой агар (ЖСА) или другие питательные среды, предназначенные для роста стафилококков, разрешенных к применению в установленном порядке. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18 - 48 часов.

Для подтверждения принадлежности колоний к *S. aureus* подозрительные колонии отсевают на скошенный в пробирке питательный агар для дальнейшего исследования. Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18 - 24 часов.

После инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму или тест Греггера) и наличие плазмокоагулирующей активности в реакции плазмокоагуляции (РПК).





Нормирование

- ПРИНЦИПЫ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ
- САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
- Критерием удовлетворительного качества санитарной обработки оборудования, посуды, инвентаря и др. служит отсутствие на поверхности обработанных предметов санитарно-показательных, условно-патогенных, а также патогенных микроорганизмов.

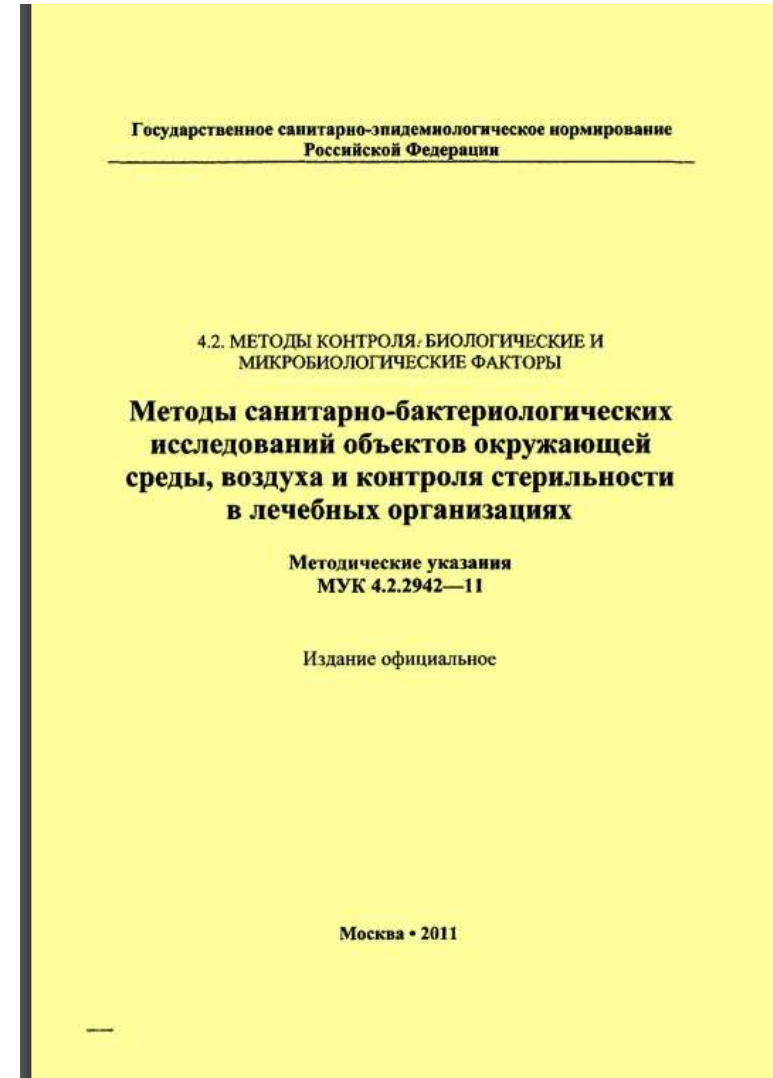


Нормативная документация

- 1.1. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий"
- 1.2. ГОСТ 17.4.3.01-2017 «Межгосударственный стандарт. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб.»
- 1.3. ГОСТ 17.4.4.02-2017 «Межгосударственный стандарт. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа»
- 1.4. МУК 4.2.3695-21 Методы микробиологического контроля почвы

Нормативно-методическая документация

- СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"
- МУК 4.2.2942– 11 Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях





Нормативно-методическая документация

Методические указания МУ 3.5.1.4100-24

"Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях«

Методические рекомендации МР 3.1.0346-24

"Организация и проведение микробиологического мониторинга в медицинских организациях«

Методические рекомендации МР 4.2.0161-19

"Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах«

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 4.2.0220-20 «МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ. МЕТОДЫ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ»

Настоящие методические рекомендации (далее - МР) определяют порядок проведения санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды, с целью контроля микробной обсемененности и эффективности санитарной обработки инвентаря, оборудования, посуды, санитарной одежды и рук персонала.

Объектами, на которые распространяются настоящие МР, являются организации общественного питания населения, в том числе пищеблоки лечебных, детских, дошкольных и подростковых учреждений, торговые объекты и рынки, реализующие пищевую продукцию, предприятия пищевой промышленности и др.





Спасибо за внимание