

День 1. Ознакомление с лабораторией

Ознакомление с микробиологической лабораторией ФБУЗ « Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» и изучила инструктаж по техники безопасности ППИ №03-30.15-78.

Документы, на основании которых ведутся работы в микробиологической лаборатории:

1) Инструкция ИОТ № 03-30.15-95 по режиму безопасной работы с объектами и материалами, содержащими или подозрительными на содержание патогенными биологическими агентами III-IV групп, в лаборатории микробиологических исследований филиала ФБУЗ « Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» в городе Ачинске;

2) Инструкция о мерах пожарной безопасности в лабораториях микробиологических исследований Бюджетного учреждения;

3) Инструкция ИОТ № 01-26/27-87 по правилам безопасной ликвидации аварий при работе с патогенными биологическими агентами при проведении микробиологических и паразитологических исследований;

4) Инструкция по соблюдению санитарно-эпидемиологических требований к обращению с медицинскими отходами в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории;

5) Инструкция КДЛ Техника отбора проб биоматериалов и правила их транспортировки и бактериологический отдел клинко-диагностической лаборатории.

Отдел представляет блок помещений, изолированный от прочих подразделений запирающимися дверьми.

Электроснабжение, теплоснабжение, водоснабжение и водоотведение лаборатории — централизованные. Имеется система приточно-вытяжной вентиляции с механическими побудителями воздуха с фильтрами очистки на входе и выходе.

Лаборатория делится на «чистую» и «заразную» зоны.

«Чистая» зона:

1. Кабинет зав. лабораторией;
2. Средоварочная;
3. Комната для мед-персонала;
4. Моечная;
5. Чистая автоклавная
6. Кладовая уборочного инвентаря.

7. Санузел;

«Заразная» зона:

1. Кабинет для приема проб;
2. Посевной кабинет;
3. Кабинет для просмотра и описания культур;
4. Кабинет для изучения неспецифической микрофлоры с боксом;
5. Кабинет санитарной микробиологии с боксом;
6. «Заразная» автоклавная;
7. Кладовая уборочного инвентаря «заразной» зоны.

Коридор «чистой» и «заразной» зоны разделен дверьми, перемещение персонала из зоны в зону осуществляется через санпропускник.

Основными видами деятельности микробиологической лаборатории согласно установленного перечня номенклатуры исследований являются:

Исследование особо опасных инфекций:

1. Биологический метод:

- определение ботулотоксина (исслед. мат. – продукты питания);

2. Микробиологический метод:

- бак.посев на иерсиниоз и псевдотуберкулез (исслед.мат. – отделяемое зева, фекалии);

3. Серологический метод (РНГА, РА):

- на кишечный иерсиниоз ОЗ, О9, псевдотуберкулез (исслед. мат. – сыворотка крови);
- на эпидемический сыпной тиф реакция Провачека (исслед. мат. – сыворотка крови);
- на бруцеллез реакция Райта-Хеддельсона (исслед. мат. – сыворотка крови);

4. Метод ПЦР (обнаружение ДНК/РНК):

- иерсиниоз, псевдотуберкулез (исслед. мат. – фекалии);
- лептоспироз (исслед. мат. – кровь, моча);
- клещевой риккетсиоз (исслед. мат. – кровь с ЭДТА);
- клещевой вирусный энцефалит исслед. мат. (– кровь с ЭДТА, ликвор, моча, фекалии);
- иксодовые клещевые боррелиозы (исслед. мат. – кровь с ЭДТА, ликвор, моча, фекалии);

Микробиологические исследования:

1.Бактериологические, вирусологические, паразитологические исследования клинических материалов от человека;

2.Санитарно-микробиологические, санитарно-вирусологические, паразитологические диагностические исследования клинических материалов от человека:

- продовольственного сырья и пищевых продуктов;
- воды (питьевой, расфасованной в емкости, открытых водоемов);
- почвы, песка, снега, воздуха.

3.Серологические исследования на выявление антигенов и антител к возбудителям инфекционных и паразитарных заболеваний, бруцеллеза, сыпного тифа, дифтерии, дизентерии, сальмонеллез, брюшного тифа, иерсиниозов, клещевого вирусного энцефалита, клещевого боррелиоза, лямблиоза, трихинеллеза, описторхоза и других инфекций и инвазий, определение столбнячного и дифтерийного токсина и антитоксина;

4.Молекулярногенетические исследования с целью выявления ДНК (РНК) возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы;

5.Токсикологические исследования методом биотестирования на гидробионтах и во дорослях;

7.Определение суммарной мутагенной активности в воде (в т. ч. расфасованной в емкости), воздухе, промышленных и бытовых отходах.

8.Исследования выполняются на определение широкого спектра микроорганизмов (в том числе бактерий, вирусов, простейших и гельминтов) III-IV групп патогенности.

Вирусологические диагностические исследования клинических материалов от человека:

- Энтеновирусы (исследуемый материал – спинномозговая жидкость, смыв с ротоглотки, фекалии);
- Исследование биологических материалов на грипп (методом РИФ);
- Носоглоточный мазок на вирусы гриппа, ОРВИ (культура клеток).

Санитарно-вирусологические исследования:

- воды (в том числе питьевой, открытых водоемов).

Серологические исследования -

на выявление антигенов и антител к возбудителям инфекционных и паразитарных заболеваний, в том числе клещевого вирусного энцефалита, клещевого боррелиоза, гриппа

и ОРВИ, кори, краснухи, лямблиоза, трихинеллеза, описторхоза, лихорадка Западного Нила, рота-, нора-, астровирусы и других инфекций.

День 2. Техника безопасности

1. На работу в микр. лабораторию принимаются лица не моложе 18 лет;
2. С принимаемыми на работу лицами проводят первичный вводный инструктаж на рабочем месте по вопросам охраны труда и режима работы лаборатории.
3. Все виды инструктажа и обучения должны проводиться согласно «Инструкции о проведении инструктажа по безопасным приемам и методам работы в учреждениях системы Минздрава»
4. Распаковка материала, присланного для исследования, проводится с соблюдением мер предосторожности: банки и пробирки, содержащие материал, обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы или штативы.
5. Посев инфекционного материала в пробирки и чашки Петри производят вблизи от огня горелки с обжиганием петли, пипетки, краев пробирки.
6. Во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, а пробирки – в штативы. Размещение посевов патогенных бактерий непосредственно на столах недопустимо.
7. Насасывание в пипетки растворов химических реактивов и жидкостей, содержащих возбудителей инфекционных заболеваний, производят с помощью резиновой груши, насасывание ртом не допускается.
8. С целью контроля за загрязнением воздуха в санитарно-гигиенических отделениях лабораторий следует периодически брать анализы на вредные вещества, а в боксах микробиологических лабораторий – не менее 2 раз в неделю на патогенные микроорганизмы.

Инструкция для медицинского работника, ответственного за прием материала:

1. Принять от пациента материал, оценить качество и объем полученного образца;
2. Если материал имеет удовлетворительное качество, образец регистрируется, маркируется, промаркированный флакон помещается в штатив;
3. Внести необходимые данные в «Журнал регистрации диагностического материала».

На основании приказа управления здравоохранения администрации Красноярского края от 09.07.01. №297 «О профилактике профессионального заражения» при возникновении аварийной ситуации необходимо немедленно:

1. **При порезе или проколе инструментом, контактирующим с биологическими жидкостями:**

1. Снять перчатки;
2. Если идет кровь – не останавливать;
3. Если крови нет, то выдавить несколько капель крови, обработать ранку 70% спиртом, вымыть руки под теплой водой с двукратным намыливанием, а затем обработать 5% спиртовым раствором йода

2. При попадании биологических жидкостей:

1. На незащищенную кожу – обработать кожу 70% спиртом, вымыть руки дважды с мылом под теплой водой, повторно обработать 70% спиртом;
2. В глаза – промыть под струей воды и закапать 1% водный раствор борной кислоты или 1% раствор азотнокислого серебра или промыть 0,05% раствором марганцовокислого калия;
3. В нос – промыть струей воды и закапать 1% раствором протаргола или обработать 0,05% марганцовокислого калия;
4. В рот – прополоскать водой, а затем 1% водным раствором борной кислоты или 0,05% марганцовокислого калия или 70% этиловым спиртом;

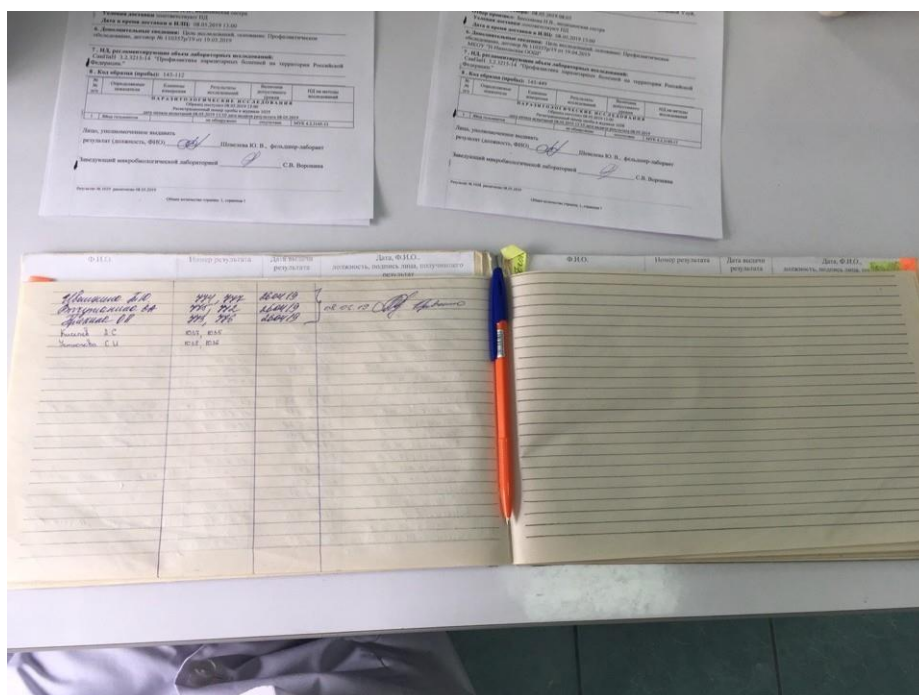
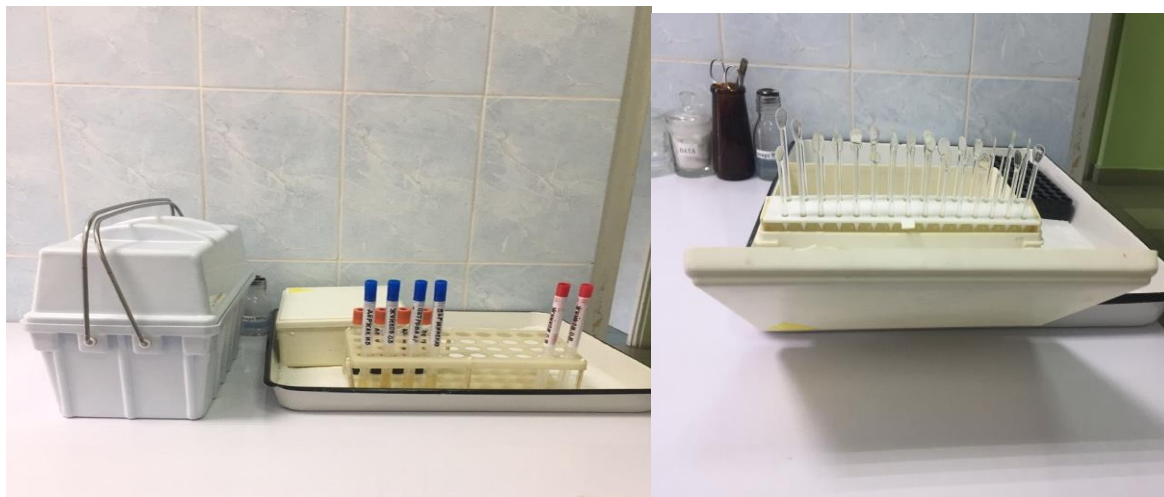
3. При аварии во время работы на центрифуге:

1. Открывать крышку медленно и только спустя 40 минут после остановки;
2. Все центрифужные стаканы и разбитое стекло поместить в дез. раствор на 2 часа, центрифугу обработать дез. средством;
3. Следует поставить в известность врача, ответственного за организацию мед.помощи больным в данной территории, зав. отделением, старшую мед. сестру, и зарегистрировать данный факт в журнал аварийных ситуаций, который хранится на рабочем месте.

День 3. Прием и регистрация биоматериала

Доставка биоматериала осуществляется в окне приема в термоконтейнере с последующим указанием в журнале времени доставки проб и непосредственной их маркировкой.

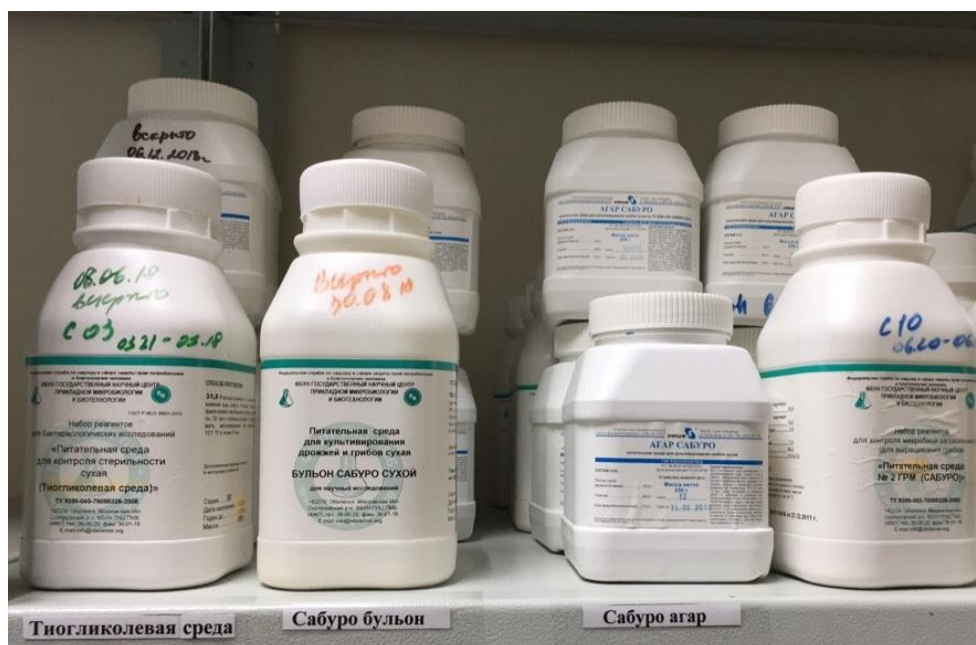
При транспортировке контейнеры с кровью и другим биоматериалом должны быть плотно закрыты, прочно установлены, чтобы предотвратить их опрокидывание. Также необходимо обеспечить соответствующий температурный режим, в зависимости от вида лабораторных исследований.



День 4-5. Приготовление питательных сред

Для культивирования микроорганизмов применяются специальные субстраты – питательные среды, которые создают оптимальные условия для жизнедеятельности возбудителей. Выделяют следующие требования к ним: питательность сред, изотоничность, стерильность, обладание необходимым окислительно-восстановительным потенциалом, унифицированность.

Перед приготовлением питательных сред организуют рабочее место: подготавливают дистиллированную воду, мерные стаканы, посуду для варки сред определенного объема (эмалированную или алюминиевую), электронные весы.



Выделяют этапы приготовления сред:

- 1) варка;
- 2) установление оптимальной величины pH;



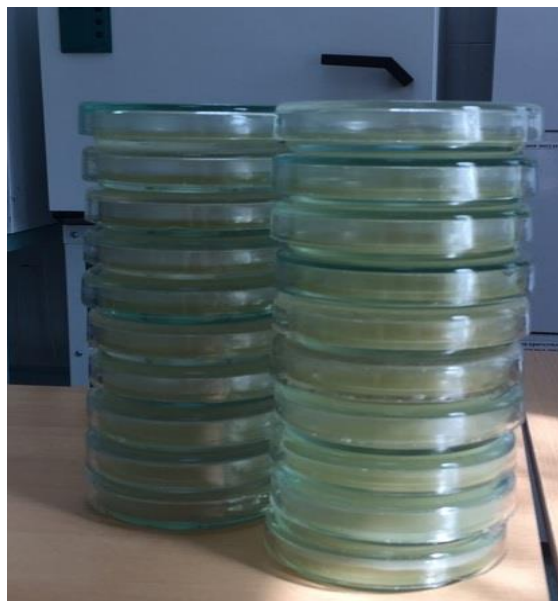
- 3) осветление;
- 4) фильтрация;

- 5) разлив;
- 6) стерилизация;
- 7) контроль.

Все среды приготавливают согласно инструкции, указанной на упаковке. Взвешивают установленное количество грамм среды на электронных весах.



Размешивают в небольшом количестве дистиллированной воды, затем ставят на печь. Разливают среды в чистые сухие пробирки либо флаконы, колбы, стерильные чашки Петри не более чем на 2/3 емкости. Посуду закрывают ватно-марлевыми пробками, поверх надевают бумажные колпачки. Маркируют посуду со средами, указывая название среды и дату приготовления.



Стерилизация сред зависит от состава и указана в ее рецепте, возможна стерилизация автоклавированием.

Для контроля готовых сред их ставят в термостат на 2 суток и просматривают: при отсутствии роста по истечении времени их считают стерильными.

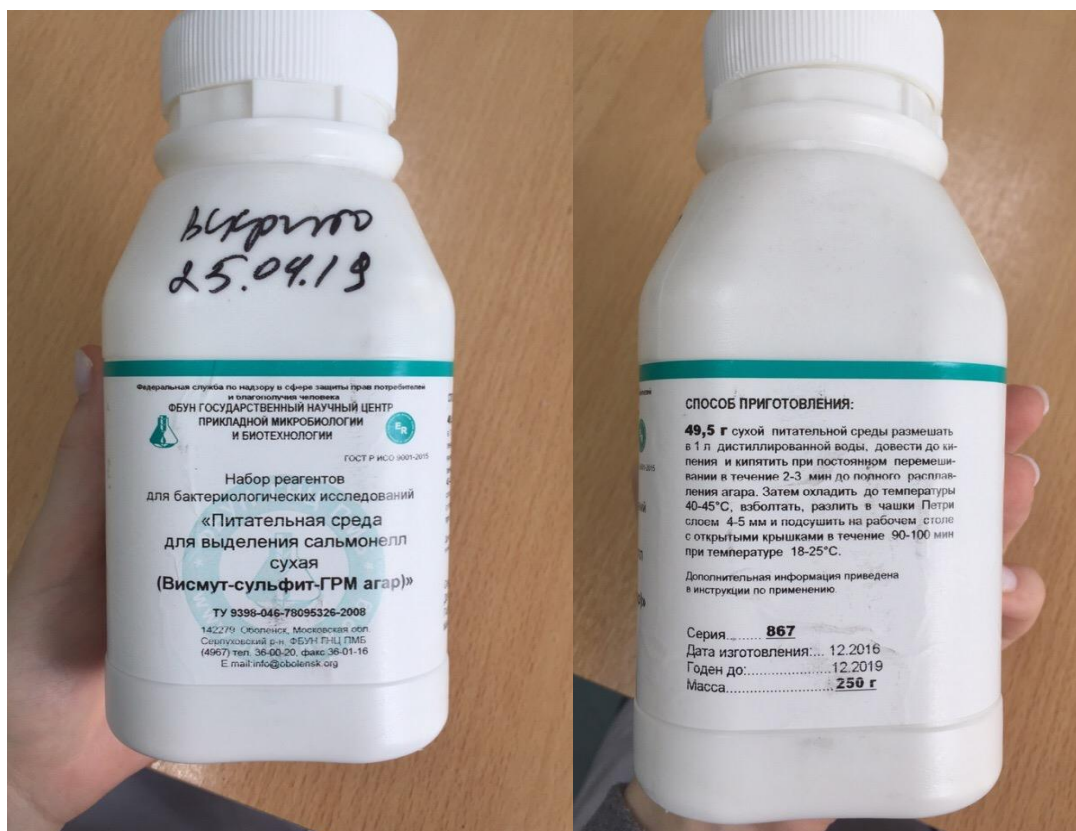


Хранят готовые среды в холодильниках.

Сроки и условия хранения готовых питательных сред					
№ п/п		Наименование среды	Условия хранения в холодильнике	Сроки	Нормативный документ
1 полка	1	ГРМ-агар (флаконы)	(2-8) ⁰ С	1 месяц	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
	2	Стафилококкагар (флаконы)	(2-8) ⁰ С	15 дней	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
2 полка	1	Транспортная среда на дифтерию	(2-8) ⁰ С	1 месяц	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
	2	Физиологический раствор 0,9%	(2-8) ⁰ С	1 месяц	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
	3	Дистиллированная вода	(2-8) ⁰ С	1 месяц	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
3 полка	1	ГРМ-бульон (флаконы)	(2-8) ⁰ С	1 месяц	МУК 4.2.3065-13
	2	10 кратный ГРМ-бульон (флаконы)	(2-8) ⁰ С	1 месяц	МУ 04-72/03
	3	Питательный бульон для выделения листерий (ПБЛ-1)	(2-8) ⁰ С	7 дней	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
	4	1% пептонная вода с Андраде	(2-8) ⁰ С	1 месяц	МУК 4.2.3065-13
4 полка	1	Висмут-сульфит ГРМ-агар	(2-8) ⁰ С	3 суток	И ФБУН ГНЦ ГИМБ, Оболонск
ящики	1				
	2	Коринетоксагар	(2-8) ⁰ С	14 дней	МУК 4.2.3065-13

Варка питательных сред:

Среда Висмут-сульфит-ГРМ агар - питательная среда для выделения сальмонелл, сухая.



Висмут-сульфит-ГРМ агар Оболенск предназначен для бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии с целью выделения сальмонелл из исследуемого материала.

Висмут-сульфит-ГРМ агар представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета, получаемый смешиванием сухих компонентов. Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

Свежеприготовленная среда, благодаря бриллиантовой зелени и висмуту лимоннокислому, входящих в состав среды, обладает сильным ингибирующим эффектом в отношении сопутствующей микрофлоры.

Дифференцирующее действие среды основано на том, что образуемый бактериями из сульфата железа сероводород, вызывает почернение индикатора – цитрата висмута – вследствие перехода его в сульфид висмута, вещество черного цвета. Поэтому бактерии, образующие сероводород, формируют черные или черные с коричневым или темно-зеленым оттенком колонии, обладающие часто металлическим блеском. Среда под колониями, при этом, окрашена в черный цвет.

Висмут-сульфит-ГРМ агар обеспечивает на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов сальмонелл и их четкую дифференциацию от кишечной палочки не позднее 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. На среде отсутствует рост стафилококков, некоторых клебсиелл, подавляется роение протей и частично рост эшерихий.

Приготовление среды Висмут-сульфит-ГРМ агар Оболенск:

Порошок в количестве, необходимом для приготовления конкретной серии, тщательно размешивают в 1 л воды дистиллированной, кипятят при постоянном перемешивании в течение 3 мин до полного расплавления агара. Охлаждают до температуры 45-50 °С, взбалтывают, разливают в нестерильные чашки Петри слоем 4-5 мм и оставляют на рабочем столе с открытыми крышками для застывания и подсушивания среды в течение 90-100 мин при температуре 18-25 °С. Готовая среда в чашках непрозрачная зелено-желтого цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 3 суток при температуре хранения от 2 до 25 °С (хранить в защищенном от света месте).

Приготовление среды Гисса:

К 100 мл 1%-ой пептонной воды без селитры добавляют 0,5-1,0 % необходимого углевода или спирта (L- арабиноза, D- манноза, D- сахароза, L- инозит) и 1% индикатора Андрее или 0,1 мл 1,6%-го раствора бромтимолового синего. Готовые среды Гисса с индикатором Андрее светлые, при кислотообразовании краснеют. Среда с бромтимоловым синим зеленого цвета с травянистым оттенком, при кислой реакции- желтого цвета, при щелочной- синего.



День 6-10. Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний

Одной из основных групп возбудителей инфекционных заболеваний, которую исследуют в лаборатории, является семейство энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*). Его представители вызывают острые кишечные инфекции. Все кишечные бактерии – Гр(-) палочки, факультативные анаэробы, хорошо растущие на простых питательных средах.

Выделяют:

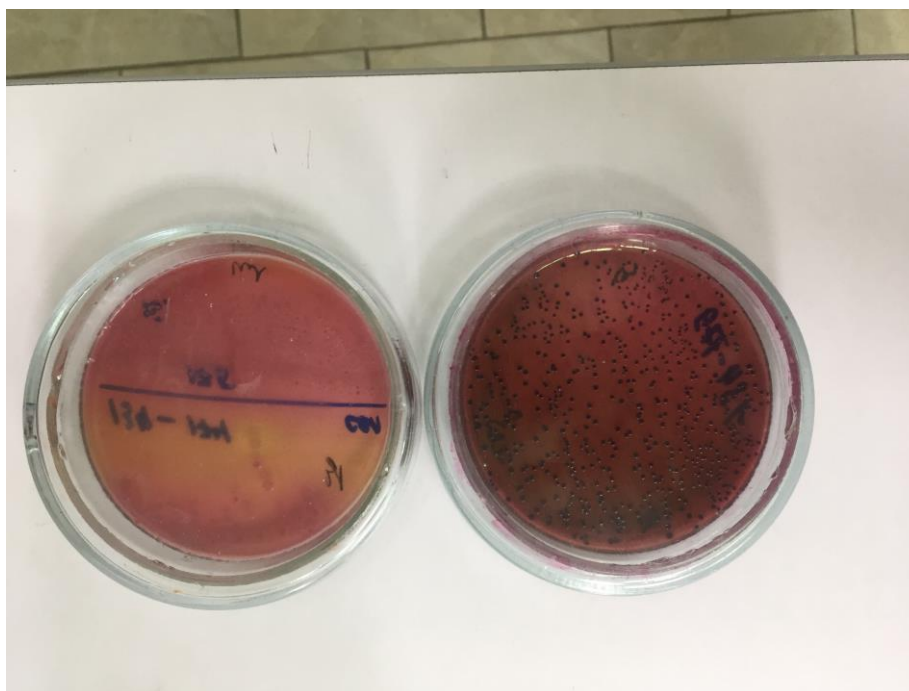
1. Условно-патогенные бактерии (37 видов различных родов): клебсиеллы, протей, иерсинии, энтероколитика, синегнойная палочка и др.
2. Патогенные бактерии: ЭПКП, возбудители дизентерии, сальмонеллеза, брюшного тифа и др.

***Семейство Enterobacteriaceae, род Escherichia, вид Энтеропатогенная
кишечная палочка (ЭПКП)***

Короткие Гр (-) подвижные палочки, хорошо растущие на простых питательных средах при 37°C и pH 7,2-7,8. Иногда образуют капсулу, спор не образуют.

Факультативные анаэробы. На МПА – мутноватые, выпуклые влажные колонии, на МПБ – равномерное помутнение.

Дифференциально-диагностические среды – Эндо (малиново-красные колонии), ЭМС (темно-фиолетовые колонии).



Ферментативные свойства:

Вид	Тест
-----	------

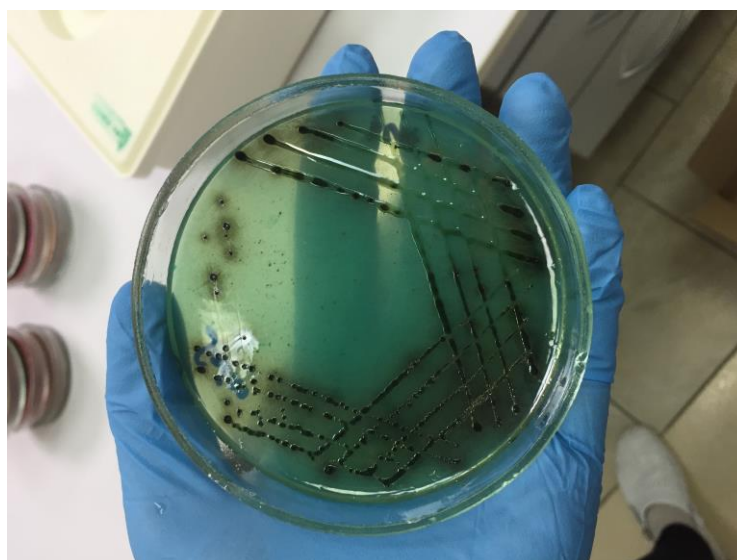
	Серовод	Уреа	Лакт	Glc	Индол	Симмонса цитрат	Подвижность	Ацетатный агар
ЭПК П	-	-	-	КГ	+	-	+	+

Исследуемый материал – испражнения, рвотные массы.

Семейство Enterobacteriaceae, Род Salmonella, Вид S.typhi

Мелкие подвижные Гр(-) палочки с закругленными концами, спор и капсул не образуют.

Факультативные анаэробы, не требовательные к питательным средам. Хороший рост на МПА и МПБ при 37°C, pH 7,2-7,4. На МПА – нежные полупрозрачные выпуклые блестящие колонии, на МПБ – равномерное помутнение. На висмут-сульфитном агаре – колонии черного цвета. На дифференциально-диагностических средах Эндо, ЭМС, Плоскирева – бесцветные колонии. Среда обогащения – селенитовый бульон, среда Мюллера. Элективные среды: желчь (10-20%), среда Раппопорт.



Ферментативные свойства:

Вид	Тест								
	Лакт	Glc	Сах	Маннит	Мальт	Индо л	Серово дород	Лакмусовое молоко	Желатин
<i>S. typhi</i>	-	К	-	К	К	-	+	К	-

Исследуемые материалы – испражнения, кровь, моча, дуоденальное содержимое.

День 10. Серодиагностика РА

Выявление в биоматериале антигенов бактерий является одним из основных способов диагностики инфекционных болезней, а обнаружение специфических антигенов

у изолятов микроорганизмов позволяет идентифицировать их на родовом, видовом и серотиповом уровнях. Наиболее широко применимы в лабораторной практике серологические реакции: реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК).

Реакция агглютинации

Агглютинация - это склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток под действием антител в присутствии электролита (изотонического раствора хлорида натрия). Группы склеенных бактерий (клеток) называют агглютинатом. Для реакции агглютинации необходимы следующие компоненты:

1. Антитела (агглютинины), которые находятся в сыворотке больного или иммунного животного.
2. Антиген - взвесь живых или убитых микробов, эритроцитов или других клеток.
3. Изотонический (0,9%) раствор хлорида натрия.

Реакцию агглютинации для серодиагностики применяют при брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля), при бруцеллезе (реакция Райта и Хеддлсона), туляремии и т.д. Антителом при этом является сыворотка больного, а антигеном известный микроб. При идентификации микробов или других клеток антигеном служит их взвесь, а антителом - известная иммунная сыворотка. Эту реакцию широко применяют для диагностики кишечных инфекций, коклюша и др.

Реакция агглютинации на стекле. На обезжиренное предметное стекло наносят две капли специфической (адсорбированной) сыворотки и каплю изотонического раствора хлорида натрия. Неадсорбированные сыворотки предварительно разводят в соотношении 1:5 - 1:100. Культуру петлёй или пипеткой тщательно растирают на стекле, а потом вносят в каплю изотонического, раствора хлорида натрия и в одну из капель сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси.

Внимание! Нельзя переносить культуру из сыворотки в каплю изотонического раствора хлорида натрия, которая является контролем антигена. Если контроль сыворотки остаётся прозрачным, в контроле антигена наблюдается равномерная муть, а в капле, где культура смешана с сывороткой, появляются хлопья агглютината на фоне прозрачной жидкости, результат реакции считается положительным.

«О» «К» Диагностическая Физиологический сыворотка +культура, раствор + культура.

День 11. РП

Реакция преципитации

РП - это иммунная реакция взаимодействия антител с антигенами в присутствии электролитов, причем антиген находится в растворимом состоянии. При преципитации происходит осаждение растворимых антигенов антителами, что проявляется помутнением в виде полос преципитации. Образование видимого преципитата наблюдается при смешивании обоих реагентов в эквивалентных соотношениях. Избыток одного из них снижает количество осаждающихся иммунных комплексов. Существуют различные способы постановки реакции преципитации.

Реакция кольцепреципитации ставится в преципитационных пробирках с малым диаметром. В пробирку вносят иммунную сыворотку и осторожно наслаивают растворимый антиген. При положительном результате на границе двух растворов образуется кольцо молочного цвета. Реакция кольцепреципитации, с помощью которой определяют наличие антигенов в органах и тканях, экстракты которых кипятят и фильтруют, называется реакцией термопреципитации (реакция Асколи для определения термостабильного сибиреязвенного антигена).

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело.

Если же комплекс антиген—антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

РСК проводят в две фазы:

1-я фаза — инкубация смеси, содержащей три компонента антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз; реакция отрицательная.

РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса (реакция Вассермана).

День 13. РИФ

Реакция иммунофлюоресценции

Иммунофлюоресцентная реакция является непрямым вариантом серологического исследования.

Начинается реакция с подготовки растворов, затем сыворотки и их контрольные образцы подвергаются титрованию. Подготовленные ранее разведения и их контрольные образцы аккуратно наносятся на предметные стёкла с антигеном. Потом препараты подвергаются инкубации, затем следует их отмывание и высушивание на воздухе. На стёкла с антигеном тонким слоем наносится антисыворотка, после этого производится вторичная инкубация препаратов и, вся предыдущая цепь действий повторяется, завершаясь высушиванием препарата. В результате препарат на предметном стекле подвергается обработке глицерином и исследуется в люминесцентном микроскопе. Результаты проведённой реакции оцениваются по четырём бальной шкале, которая характеризуется интенсивностью поверхностного жёлто-зелёного свечения клеток антигенов:

«+» очень слабое свечение клетки, заметное только на её периферии;

«++» слабое свечение периферии клетки, но с явно заметным зелёным оттенком;

«+++ /++++» яркое свечение зелёного цвета периферии клетки Титром реакции считается такое разведение сыворотки, где не менее 50 % клеток антигена проявляют чёткое поверхностное свечение, то есть результат реакции +++ или +++. Значение титра реакции от 1/80 до 1/100.

День 14. РПГА

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА или РПГА) -

разновидность РА. Обладает высокой чувствительностью. С помощью РПГА можно:

- 1) определить антитела в сыворотке крови больного, к которой добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум;
- 2) определить наличие антигенов в исследуемом материале.

При положительной реакции, пассивно склеенные эритроциты покрывают дно лунки ровным слоем с фестончатыми краями (зонтик); при отрицательной – эритроциты скапливаются в центральном углублении лунки, образуя компактную «пуговку» с резко очерченными краями.

Диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный Ви-антигенный жидкий - Предназначен для выявления в сыворотке крови человека специфических антител к Ви-антигену сальмонелл тифа в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). В качестве анализируемых образцов используют образцы сыворотки крови человека.

При контроле любого количества анализируемых сывороток обязательна постановка 1 ряда агглютинации с сывороткой диагностической сальмонеллезной адсорбированной рецептор Ви сухой.

Для постановки РПГА используют планшет для иммунологических реакций однократного применения. Готовят двукратные серийные разведения анализируемых сывороток в 0,05 мл прилагаемого 0,9 % раствора натрия хлорида начиная с 1:10 до 1:2560 и 1 ряд двукратного серийного разведения сыворотки диагностической сальмонеллезной адсорбированной рецептор Ви сухой, начиная с разведения 1:10, до удвоенного титра, указанного на этикетке флаконов данной сыворотки.

В каждую из лунок с разведениями сыворотки прибавляют по 0,025 мл диагностикума.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Положительной считается реакция не менее чем на 3+.

Результаты, полученные в РПГА можно считать достоверными в том случае, если сывороткой диагностической сальмонеллезной адсорбированной рецептор Ви сухой 1:10 получен положительный результат в разведении не ниже чем 14 их титров, а в 2 лунках с анализированной сывороткой и с сывороткой диагностической сальмонеллезной адсорбированной рецептор Ви сухой в разведениях 1:10 не должно быть хлопьев и осадка; в лунках с 0,9 % раствором натрия хлорида и диагностикумом - реакция отрицательная.

Титром антител анализируемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, которая еще дает положительную агглютинацию эритроцитов.

Лица, у которых обнаруживаются антитела к Ви-антигену в разведении 1:40 и выше, рассматриваются как подозрительные на хроническое брюшнотифозное бактерионосительство. Однако, в связи с тем, что диагноз не может быть поставлен только на основании серологического исследования, необходимо углубленное бактериологическое обследование



День 15. Дезинфекция, стерилизация и утилизация материала

Стерилизация – полная инаktivация микробов в объектах, подвергающихся обработке. Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. Для тепловой стерилизации применяют, в основном, сухой жар и пар под давлением. Стерилизацию сухим жаром осуществляют в воздушных стерилизаторах («сухожаровые шкафы»), которые представляют собой металлический плотно закрывающийся шкаф, нагревающийся с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 1600С в течение 120 мин. Стерилизуют сухим жаром лабораторную посуду и другие изделия из стекла, инструменты, силиконовую резину. Обработку паром под давлением в паровых стерилизаторах (автоклав) является наиболее универсальным методом стерилизации. Поскольку кроме высокой температуры на микробы оказывает воздействие и пар, споры погибают уже при 1200С. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2атм – 1210С – 15-20 мин. Стерилизуют в автоклаве большую часть предметов: перевязочный материал, белье, питательные среды, растворы, инфекционный материал. В настоящее время применяют еще один метод тепловой стерилизации, предназначенный специально для молока – ультравысокотемпературный (молоко обрабатывают в течение нескольких секунд при 130-1500С).

Дезинфекция – процедура, предусматривающая обработку загрязненного микробами предмета с целью их уничтожения до такой степени, чтобы они не смогли вызвать инфекцию при использовании данного предмета. При дезинфекции погибает большая часть микробов (в том числе все патогенные), однако споры и некоторые резистентные вирусы могут остаться в жизнеспособном состоянии.

Если отсутствует возможность подвергнуть предмет стерилизации, проводится дезинфекция. Например, нельзя простерилизовать бокс, в котором ведутся работы с заразным материалом, операционный стол, руки хирурга или оптоволоконные микроскопы. После дезинфекции нет необходимости защищать продезинфицированный материал от попадания микробов извне.

Правила обращения с утилизацией, разработаны в соответствии с требованиями санитарных правил и норм на основании: «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами СанПиН 2.1.7.2790-10»

Класс А - эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (далее – ТБО): мебель, инвентарь, неисправные приборы и

оборудование, не содержащие токсических элементов; неинфицированная бумага, упаковочный материал.

Класс Б - эпидемиологически опасные отходы: отходы с микроорганизмами III-IV групп патогенности(опасности), упаковка и контейнеры из под проб.

Класс Г - токсикологически опасные отходы (отходы по составу близкие к промышленным) ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование (люминесцентные и бактерицидные ртутьсодержащие лампы, термометры).

Организационная в бактериологическом отделе система сбора, временного хранения и удаления отходов является частью общих утвержденных в организации мер и состоит из следующих этапов: Сбор и хранение внутри подразделения, Обеззараживания/обезвреживания отходов в бактериологическом отделе, Транспортировка и загрузка в специальные контейнеры за пределы лаборатории, Транспортировка за пределы учреждения (на основании договора вывоз отходов), Организации обучения персонала правилам эпидемиологической безопасности при обращении с отходами.

В качестве тары для сбора мусора используют одноразовые пакеты с соответствующей маркировкой (цветовой и текстовой). Пакеты для отходов класса А – белого цвета, для отходов класса Б – желтого цвета. Норматив заполнения пакета не более $\frac{3}{4}$ объема, максимальная вместимость до 15кг. Для транспортировки используют тележки и закрывающиеся контейнеры.

Контейнеры для сбора каждого вида отходов должны быть однотипны, хорошо различимы от контейнеров для отходов другого типа, снабжены плотно закрывающимися крышками.

Вывоз отходов классов А и Б осуществляется ежедневно согласно договору со специализированным учреждением. Отходы класса Г (отработанные люминесцентные и бактерицидные лампы, термометры) вывозят по мере необходимости транспортом специального учреждения по договору. Отходы класса Б подлежат обеззараживанию в отделе химическим и (или) физическим способами. Для дезинфекции отходов класса Б химическим способом используют дезинфицирующие средства, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации, в концентрациях и времени экспозиции, указанных в соответствующих рекомендациях по их применению. Приготовление дезинфицирующих растворов, маркировка емкостей с дезинфицирующим раствором, соблюдение условий хранения и сроков годности контролируется в отделе ответственным лицом. Дезинфекция отходов класса Б физическим способом осуществляется водяным насыщенным паром с избыточным давлением (автоклавированием) с соблюдением режимов обеззараживания, указанным в

Федеральных санитарно-эпидемиологических правилах «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08» (в ред. Дополнений и изменений № 1 утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 02.06.2009 № 42). После аппаратного обеззараживания с применением насыщенного водяного пара и изменения внешнего вида отходов, отходы класса Б могут временно храниться, транспортироваться и захораниваться с отходами класса А. Упаковка обеззараженных медицинских отходов класса Б должна иметь маркировку, свидетельствующую о проведенном обеззараживании.



День 16. Проведение контроля качества внутрилабораторных исследований

Отбор проб на стерильность проводит специалист после хождения инструктажа по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа. Все изделия медицинского назначения, подлежащие контролю, направляют в микробиологическую лабораторию в упаковке, в которой осуществляли их стерилизацию, дополнительно заворачивают в стерильную простыню или помещают в стерильную наволочку.

При стерилизации изделий в неупакованном виде в отделении отбор проб проводят в стерильные емкости, соблюдая правила асептики.

Контроль стерильности проводят путем прямого посева (погружения) изделий целиком (при их небольших размерах) или отдельных деталей (разъемные изделия) и фрагментов (отрезанные стерильными ножницами кусочки шовного, перевязочного материала и т. п.) в питательные среды. При посеве изделия или его части непосредственно в питательную среду количество среды в пробирке (колбе, флаконе и т. д.) должно быть достаточным для полного погружения изделия или его части.

При проверке стерильности более крупных изделий проводят отбор проб методом смывов с различных участков поверхности изделий: с помощью стерильного пинцета (корнцанга) каждый участок тщательно протирают марлевой салфеткой (размер салфетки 5 × 5 см), увлажненной стерильной питьевой водой. Каждую салфетку помещают в отдельную пробирку (колбу, флакон) с питательной средой.

У изделий, имеющих функциональные каналы, рабочий конец опускают в пробирку с питательной средой и с помощью стерильного шприца или пипетки 1—2 раза промывают канал этой средой.

Контроль стерильности проводят путем прямого посева (погружения) изделий целиком (при их небольших размерах) или отдельных деталей (разъемные изделия) и фрагментов (отрезанные стерильными ножницами кусочки шовного, перевязочного материала и т. п.) в питательные среды.

Для контроля стерильности используют следующие питательные среды: тиогликолевую, бульон Сабуро (с ингибитором посторонней микрофлоры – теллурид калия или левомицетин).

При контроле изделий каждого наименования обязателен одновременный посев на обе указанные питательные среды.

На каждый вид исследуемого материала используют по две пробирки каждой среды.

При посеве изделия или его части непосредственно в питательную среду количество среды в пробирке (колбе, флаконе и т. д.) должно быть достаточным для полного погружения изделия или его части.

4Посевы в тиогликолевой среде выдерживают в термостате при температуре 32 °С. Посевы в бульоне Сабуро – при температуре 20—22 °С в течение 14 суток при контроле изделий, простерилизованных растворами химических средств и газовым методом, в течение 7 суток – простерилизованных физическими методами (паровой, воздушный).

Учет результатов исследования на стерильность

При отсутствии роста микроорганизмов во всех пробирках (колбах, флаконах) делают заключение о стерильности изделий. Материал не стерилен при росте микрофлоры.

День 17. Санитарная микробиология исследования воздуха

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды проводят в помещениях лечебных организаций в зависимости от их функционального назначения на санитарно-микробиологические 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.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппаратов и устройств, разрешенных к применению в установленном порядке.



Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм³ для определения общего количества микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов и 250 дм³ для определения *S. aureus*. Исследование воздуха седиментационным методом не допускается.

Для определения общего количества микроорганизмов в 1 м³ воздуха забор проб проводят на питательный агар типа МПА, СПА, ГРМ-агар и другие, приготовленные

согласно инструкций по применению. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение (48 ± 2) ч, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 м³ воздуха. При наличии роста колоний дрожжевых и плесневых грибов, их подсчитывают и делают пересчет на 1 м³ воздуха. В протоколе количество дрожжевых и плесневых грибов указывают отдельно.

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 спиртом (70 %).

День 18. Санитарная микробиология исследование смывов с рук и окружающей среды

Исследования микробной обсемененности объектов внешней среды

Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды предусматривает определение стафилококков, бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, синегнойной палочки. Отбор проб с поверхностей различных объектов осуществляют методом смывов. По эпидемиологическим показаниям номенклатура исследований микробной обсемененности объектов внешней среды может быть расширена.

Взятие смывов производят стерильными ватными тампонами, вмонтированными в пробирки. Для увлажнения тампонов в пробирки наливают по 2,0 мл стерильной 0,1 % пептонной воды с добавлением нейтрализаторов дезинфицирующих средств.

При контроле мелких предметов смывы забирают с поверхности всего предмета. При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят в нескольких местах исследуемого предмета общей площадью примерно 100 см².

Для обнаружения стафилококков делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл 6,5 % солевого бульона. Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч, после чего делают высев на желточно-солевые среды на основе сред: элективно-солевой агар, стафилококкагар, манитолагар или среда № 10 по ГФ XII, агар Байд-Паркер. Для обнаружения бактерий группы кишечных палочек делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл среды Кесслера. Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч и делают пересев на среду Эндо. Выросшие колонии на среде Эндо подвергают дальнейшему изучению для установления их возможной принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Для обнаружения сальмонелл делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл одной из сред обогащения (магниевая, селенитовая или среда Раппапорта-Вассилиадиса). Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение 18—20 ч, делают пересев на среду Эндо и висмут-сульфит агар с последующим отбором подозрительных колоний и их идентификацией.

Для обнаружения синегнойной палочки делают высев на среду № 8 (бульон для накопления стафилококков и синегнойной палочки) и среду № 9 (для определения синегнойной палочки по наличию пигмента пиоцианина) или питательные среды в соответствии с ГФ XII. Колонии, подозрительные на синегнойную палочку (колонии с ровными или слегка волнистыми краями, гладкой блестящей поверхностью с

характерным запахом и пигментом, однако, следует учесть, что запах и пигмент могут сильно варьировать или вообще отсутствовать), пересевают на скошенный агар.

P. aeruginosa – грамотрицательная, подвижная, оксидазоположительная палочка, окисляющая, но не ферментирующая глюкозу, дающая рост при 42 °С.

Бактериологический контроль эффективности обработки рук персонала

Смывы с рук персонала производят стерильными марлевыми салфетками размером 5 × 5 см, смоченной в нейтрализаторе. Марлевой салфеткой тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук. После отбора проб марлевую салфетку помещают в широкогорлые пробирки или колбы с физиологическим раствором и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 мин. Жидкость засевают глубинным способом на 2 чашки Петри с мясопептонным агаром (по 0,5 мл) и в 2 пробирки с 0,5 %-м сахарным бульоном (по 1 мл). Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч.

Учет результатов

Отсутствие роста патогенных и условно патогенных бактерий.

