

1 день 11. 05. 2018г.

Мы были ознакомлены с Бактериологическим отделом КДЛ КГБУЗ «КККОД им. А.И.Крыжановского». Непосредственно был проведен инструктаж по ТБ старшим лаборантом Мельман Н. А.

Документы на основании которых ведутся работы в Бактериологическом отделе КДЛ:

1. Инструкция № 001 БО «По правилам соблюдения противоэпидемического режима (режима биологической безопасности) в бактериологическом отделе клинко – диагностической лаборатории»;
2. Инструкция 003 БО «Порядок действий по безопасности ликвидаций аварий при работе с патогенными биологическими агентами (ПБА) III- IV групп патогенности (опасности) в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории»;
3. Инструкция № 004 БО «По соблюдению санитарно-эпидемиологических требований к обращению с медицинскими отходами в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории»;
4. ИОТ - № 32 КДЛ «Инструкция по охране труда для персонала клинко-диагностической лаборатории»;

Краткая характеристика объекта.

Бактериологический отдел КДЛ является структурным подразделением клинко-диагностической лаборатории КГБУЗ «Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И.Крыжановского» и располагается по адресу г. Красноярск, ул. 1-ая Смоленская, дом 16, строение 7, на 2 этаже лечебно-диагностического корпуса (корпус I).

Отдел представляет блок помещений, изолированный от прочих подразделений запирающимися дверьми. Дополнительно на дверях рабочих кабинетов установлено электронные замки с устройством доступа по персональным электронным картам. Полезная площадь лаборатории 541,2 кв.м. На входной двери обозначены название отдела и международный знак «Биологическая опасность».

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

Помещения отдела разделяют на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с патогенными биологическими агентами (далее ПБА) и их хранение, и «чистую», где не проводят работы с микроорганизмами и их хранение. Коридор «чистой» и «заразной» зоны разделен дверьми (система шлюза), перемещение персонала из зоны в зону осуществляется через санпропускник. Основная деятельность бактериологического отдела связана с работой с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности).

Основными видами деятельности бактериологического отдела КДЛ являются:

- Исследование клинического материала от больных по профилю неинфекционного хирургического стационара;
- Санитарно-микробиологические исследования в рамках программы Производственного и внутрилабораторного контроля.

Сведения о помещениях бактериологического отдела КДЛ

№	Наименование помещения	Площадь (кв. м)	Назначение помещения
1	2	3	4
223	Склад		Хранение питательных сред, реагентов и расходных материалов
224	Ординаторская	22,1	Работа с документами
225	Административное помещение	13,4	
226	Комната персонала	19,5	Прием пищи, отдых
227	Склад	10,4	Хранение расходных материалов, посуды лабораторной
	Помещение для хранения уборочного инвентаря	6,1	Хранение уборочного инвентаря помещений «чистой» зоны
228	Гардероб личной и рабочей одежды с душем и туалетом	16,8	Хранение личной одежды персонала, надевание рабочей одежды
229 (1)	Подготовка питательных сред	12,0	Расплавление агаризованных питательных сред, подсушивание разлитых в чашки Петри сред
229 (2)	Предбокс	6,5	
229 (3)	Стерилизационная	12,9	Стерилизация лабораторной посуды

229 (4)	Бокс для розлива питательных сред	9,6	Асептический розлив питательных сред
	Санпропускник Персонала(чистая зона)	15,0	Смена рабочей одежды
230	Помещение для хранения готовых основ питательных сред	16,9	Хранение питательных сред и диагностических препаратов
231	Приготовление питательных сред	21,0	Приготовление питательных сред
232	Стерилизационная	14,1	Стерилизация питательных сред и лабораторной посуды
233	Моечная	18,5	Мытье и предстерилизационная подготовка лабораторной посуды
234	Помещение для хранения готовых питательных сред, находящихся на карантинизации	12,8	Хранение БПС(проходящие проверку на стерильность и чистоту розлива)
	Санпропускник персонала	18,2	Смена рабочей одежды на специальную для «заразной зоны» санитарный душ.
235	Помещение для обеззараживания («автоклавная»)	15,8	Обеззараживание ПБА
236	Бокс для посева на стерильность	7,7	Посев стерильного материала
237	Предбокс	10,1	
238	Аппаратная	14,5	Инкубация посевов, считывание результатов
239	Электрофорезная	12,3	Учет результатов электрофоретической детекции продуктов амплификации нуклеиновых кислот.
240	Помещение для хранения уборочного инвентаря и приготовления дезинфицирующих средств	14,9	Хранение уборочного инвентаря помещений «заразной» зоны, приготовление дезинфицирующих растворов
241	Материальная	12,3	Хранение одноразовых расходных материалов, используемых
242	Санитарно-бактериологические исследования	26,1	Просмотр посевов, пересевы, пересев колоний, постановка идентификационных тестов, учет результатов, микроскопия мазков.
243	Исследование	17,0	Высев на плотные

	гемокультур		питательные среды, просмотр посевов, отвивка колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов,
244	Исследование отделяемого ДП	18,4	Посев биологического материала, инкубация посевов, просмотр посевов, отвивка колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов, работа с музейными культурами.
245	Клинико-бактериологические исследования	27,8	Посев биологического материала, инкубация посевов, просмотр посевов, отвивка колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов, микроскопия мазков
246	Бактериологические исследования	20,2	Посев биологического материала, инкубация посевов, просмотр посевов, отвивка колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов
247	Выделение нуклеиновых кислот	15,1	Выделение и очистка нуклеиновых кислот
248	Приготовление реакционных смесей и внесение ДНК		
249	ПЦР в режиме реального времени	13,5	Амплификация нуклеиновых кислот и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени
250	Секвенаторная	20,0	Амплификация и секвенирование нуклеиновых кислот
251	Обработка результатов	19,3	Обработка полученных данных
252	Кладовая	9,5	Хранение наборов реагентов для ПЦР анализа
253	Прием и регистрация проб, выдача результатов	15,4	Прием проб биологического материала, маркировка, объединение или разделение проб на аликвоты для бактериологического и молекулярно-генетического исследования методом ПЦР

2 день 14. 05. 2018 г.



Мы были ознакомлены с работой в отделе клиничко – бактериологических исследований. В данном отделе осуществляется: прием проб, регистрация, посев на плотные питательные среды, приготовление мазков, микроскопия, отколы на скошенный агар и другие дифференциально – диагностические среды, постановка биохимических тестов и антибиотикограмм, заключение и оформление протокола.

Материалами для исследования в отделении клиничко – бактериологических исследований являются: кровь, ликвор, мазки из носа, зева, носоглотки, наружного уха, отделяемое язвы и др. Результаты микробиологических исследований клинического материала от пациентов с заболеваниями микробного происхождения необходимы для непосредственного установления возбудителя, оптимизации применения антимикробных (антибактериальных и противогрибковых) препаратов и мероприятий в области профилактики, контроля и сдерживания резистентности на локальном уровне - в профильных отделениях и стационаре в целом.

Спектр микроорганизмов, вызывающих послеоперационные осложнения

1. Группа коагулазонегативных /коагулазоотрицательных стафилококков (в литературе КНС/КОС) - часто вызывают катетерассоциированный сепсис. – Золотистый стафилококк (*S.aureus*), в том числе и MRSA(метициллин резистентный стафилококк ауреус, обладающий множественной устойчивостью к антибиотикам)
2. Группа энтерококков, в том числе VRE(ванкомицин резистентный энтерококк, обладающий множественной устойчивостью к антибиотикам, в том числе к ванкомицину)
3. Группа грамотрицательных палочек семейства кишечных(*E.coli*, клебсиеллы, энтеробактеры и т.д. всего более 20 родов и сотни видов)- вызывает осложнения любых локализаций, в том числе пневмонии, самая непредсказуемая в плане чувствительности к антибиотикам.
4. Группа грамотрицательных палочек – неферментёров, (в литературе НГОБ, НФГОБ), в том числе и псевдомонады (*P.aeruginosa*,) и ацинетобактеры (*A. baumani*), -вызывает осложнения любых локализаций, в том числе пневмонии. Распространены в отделениях

реанимации и интенсивной терапии. Обладают множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, в том числе последнего поколения (карбапенемы).

Изучение посевов на средах для бактериологического исследования

Посев любого клинического материала от хирургических больных осуществляется на 5 питательных средах: КА, Эндо, ЖСА, энтерококк агар, Сабуро агар (candida agar).

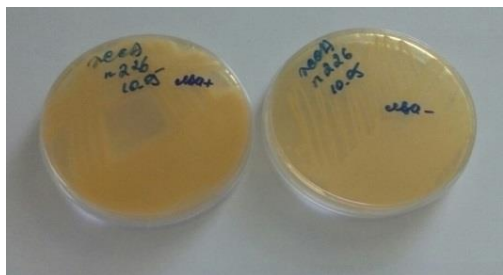
1. Кровяной агар – получают путем добавления к питательной среде 5–10% подогретой стерильной дефибринированной крови барана, кролика лошади, человека. Среда используется для выделения стрептококков, пневмококков и других бактерий, а также для изучения гемолитической активности.
2. Среда Эндо - дифференциальная среда для выделения энтеробактерий и способности использовать лактозу.
3. Желточно-солевой агар (ЖСА) – среда для выделения стафилококков, содержит до 10% хлорида натрия, что подавляет большинство бактерий, содержащихся в материале. Кроме того, эта среда является и дифференциально-диагностической, так как присутствие яичного желтка позволяет выявить фермент лецитиназу (лецитовителлазу), который образуют патогенные стафилококки. Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфорхолины и нерастворимые в воде жирные кислоты, поэтому среда вокруг лецитиназоположительных колоний мутнеет и появляется опалесцирующая зона в виде «радужного венчика».
4. Энтерококк агар - питательная среда предназначена для выделения энтерококков из клинического материала (фекальных масс, мочи, мокроты и др.), воды, пищевых продуктов и других объектов.
5. Сабуро агар - питательная среда предназначена для выращивания и подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов.

При выделении чистой культуры бактерий по Голду, внесенной на один из 4-х секторов пластинчатого агара в чашке Петри, материал равномерно штрихами засеивается по всему сектору, и петля прожигается. Охлажденной петлей материал снимается с одного из штрихов первого сектора и переносится во второй, где производится равномерный штриховой посев, аналогичный первому. В третий и четвертый сектор посев делается соответственно из второго и третьего секторов аналогично засеву второго сектора.

После инкубации в термостате наиболее густой рост бактерий выявляется в области первых штрихов первого сектора. В каждом последующем секторе выявляется менее густой рост бактерий, чем в предыдущем, или рост отдельных колоний. Отдельную колонию

отвивают на скошенный агар и идентифицируют по тинкториальным, биохимическим, серологическим свойствам. Все записи по ходу исследования осуществляется в «Рабочем журнале клинических микробиологических исследований», исследования в нем пронумеровываются и скрепляются печатью, т.к. все исследования, которые ведутся в журнале, являются биологически опасными.

Изучение диагностики дифференциации стафилококка



В отделе клинико – бактериологических исследований проводилось выделение и идентификация золотистого стафилококка (*S. aureus*).

Первым этапом (1 день) производился посев патогенного биологического материала на плотную питательную среду ЖСА. Далее чашки Петри сутки инкубировались в термостате.

Второй этап (2 день) начинался с визуального осмотра роста культуры на чашке Петри. При этом учитывается наличие лецитиназы, которое проявляется в образовании радужного венчика вокруг колонии.



Далее из характерных колоний готовились мазки, производились окраска по Граму. В ходе микроскопии окрашенных мазков и мною были выявлены грам (+) кокки. Мазки изучались на микроскопе ЛОМО с иммерсионной системой, с увеличением X10 и объектив 100.

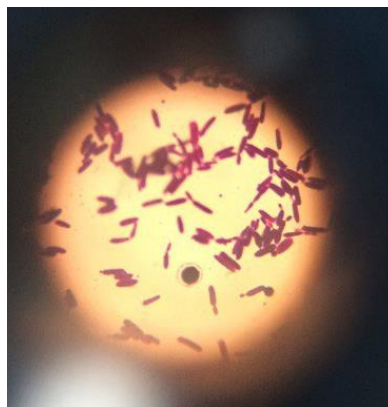
Методика окраски по Граму имеет следующий алгоритм:

1. Помещают на мазок полоску фильтровальной бумаги и наносят на фиксированный мазок несколько капель карболовый раствор генцианвиолета, и выдерживают 2-3 минуты. Сливают краску, удаляют фильтровальную бумагу и ополаскивают в проточной воде (до 30 сек).

2. Мазок заливают на 1-2 мин раствором Люголя до почернения препарата. Раствор сливают, мазок промывают водой (водопроводной или дистиллированной).
3. Дифференцируют 96% спиртом, наливая и сливая его, пока отходит синяя краска и не обесцветится мазок (приблизительно 20-60 секунд). Во время дифференцировки препарат все время покачивают. Если вместо спирта использовать ацетон, то промывание продолжается 30 сек. Можно дифференцировать смесью спирта и ацетона (1:1) 30 с. Тщательно промывают стекло в проточной или дистиллированной воде 1-2 мин.
4. Для выявления грамотрицательной группы бактерий препараты дополнительно окрашивают раствором Фуксина (несколько капель) в течение 2-3 минут.
5. Промывают в проточной воде и высушивают фильтровальной бумагой.

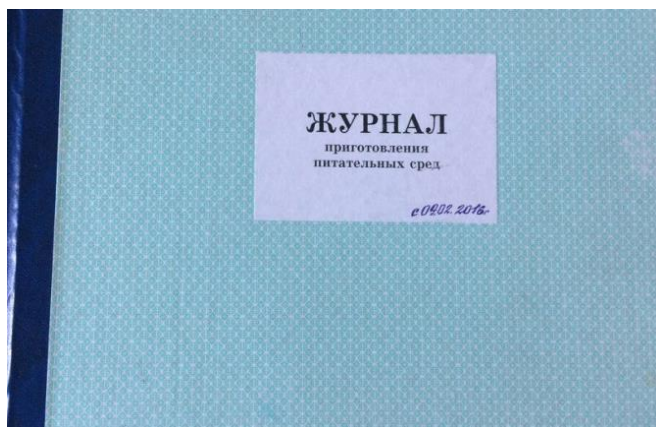
Окрашенные мазки исследуют в масле, с иммерсионным объективом; при желании заключаются в бальзам, в таком случае на окрашенный и хорошо высушенный мазок кладут каплю бальзама и покрывают покровным стеклом.

Результат окраски: грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет (темно-синий), а грамотрицательные- розово-красный, красный или коричневый.



3 день. Постановка реакции плазмокоагуляции. Цитратную плазму разводят изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:4 и наливают в две пробирки по 0,3 – 0,5 мл. В одну пробирку вносят петлю исследуемой культуры, другая пробирка служит контролем. Обе пробирки ставят в термостат при температуре 37 °С. Учет реакции производят через 2-3 ч. При отсутствии свертывания плазмы посеы оставляют при комнатной температуре на 24 ч, после чего учитывают реакцию. При наличии фермента коагулазы плазма свертывается. В контрольной пробирке консистенция плазмы не изменяется.

В отделе приготовления бактериологических питательных сред я производила регистрацию в журналах «Приготовление питательных сред», «Контроля чистоты розлива (стерильности) питательных сред №1».



3 день 15.05.18

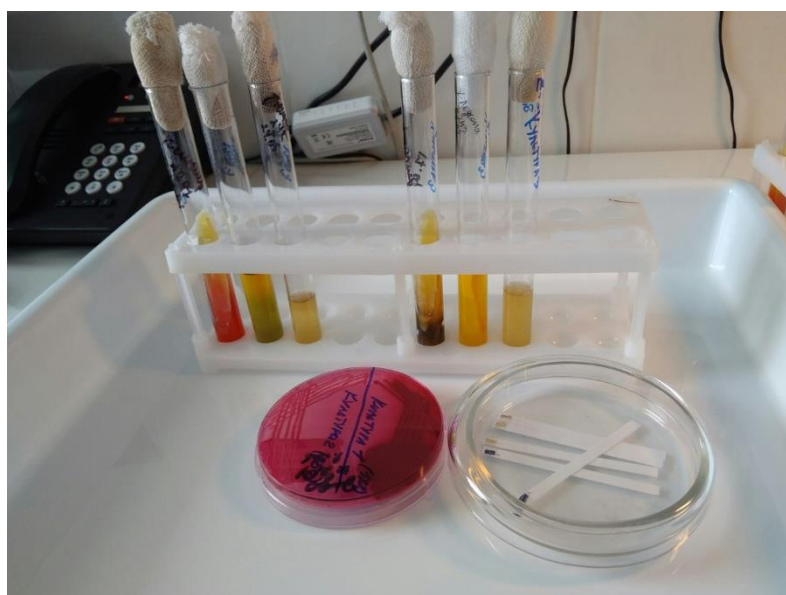
Отдел клинико – бактериологических исследований

Выполняла окраску мазков по Граму для выявления Г+/- палочек/кокков;

Завершение решения ситуационной задачи по выделению стафилококка

Оценка биохимических свойств стафилококка

- В первой пробирке столбик манита пожелтел, значит началось расщепление манита, плазма свернулась следовательно РПК+, что свидетельствует о обнаружении *S.aureus*, смывы не соответствуют норме.
- Во второй пробирке столбик манита остался изначального цвета, расщепление манита не произошло, плазма не свернулась следовательно РПК-, что свидетельствует о обнаружении *s.epidermidis*, следовательно *s.aureus* не обнаружено, смывы соответствуют норме.



Санитарная микробиология

Посев смывов на БГКП, взятых из отделения реанимации (20 шт.)

Микробиологический мониторинг направлен на контроль механизмов возможной передачи внутрибольничных инфекций (инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи), основными из которых являются воздушно-капельный, воздушно-пылевой, контактно-бытовой (через предметы ухода и руки медицинского персонала), парентеральный и искусственный.

Объектами микробиологического мониторинга являются:

- воздушная среда помещений категории А и Б, указанных в СанПиН 2.1.3.2630-10, Приложение 3;
- медицинский инструментарий многократного использования после процедуры стерилизации;
- перевязочный материал после процедуры стерилизации;
- руки персонала операционной хирургической бригады после проведения процедуры хирургической обработки перед надеванием перчаток;
- операционное поле больного, обработанное перед операцией;
- медицинский инструментарий и оборудование после процедуры дезинфекции высокого уровня (ДВУ);
- объекты окружающей среды, в том числе изделия медицинского назначения и оборудование, на условно-патогенные и патогенные микроорганизмы после процедуры дезинфекции;
- руки медицинского персонала после процедуры обработки дезинфицирующими средствами (гигиенической обработки), в том числе кожными антисептиками, разрешенными к применению, на условно-патогенные и патогенные микроорганизмы;

Отдел приготовления бактериологических питательных сред

Приготовление стерильных питательных сред: Мюллер – Хинтон агар, сердечно – мозговой бульон, с дальнейшими розливом и стерилизацией, маркировкой, регистрацией в журнале.

4 день 16.05.18

Отдел клинико – бактериологических исследований

Выполняла окраску мазков по Граму для выявления Г+/- палочек/кокков (50 шт)

Санитарная микробиология

Требования при проведении работ по отбору проб на санитарно - бактериологические исследования микробной обсемененности объектов внешней среды режимных помещений для контроля качества дезинфекции.

Отбор проб производят:

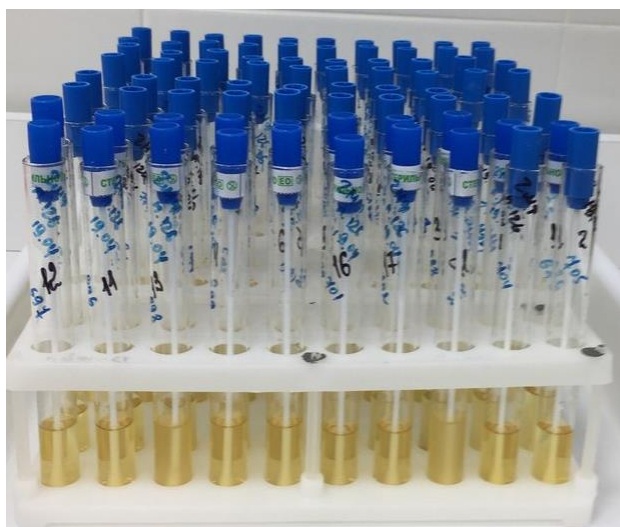
- на соответствие показателю «Отсутствие *S. aureus*, *P.aeruginosa*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*».

Для проведения смыва с поверхностей можно использовать:

- Стерильный тампон на держателе, вмонтированный в пробирку со стерильной жидкостью (0,9% раствором хлорида натрия, 0,1% пептонной водой).
- Тампон увлажняют стерильной жидкостью из пробирки, делают смыв с объекта и помещают в ту же пробирку.
- При контроле мелких предметов смывы отбирают с поверхности всего предмета.
- Одним тампоном можно производить, смыв с нескольких однородных мелких предметов.
- При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят с площади не менее 100 см² (квадрат 10*10 см), тщательно протирая поверхность.
- Окончательный результат по показателю оформляется заключением «Роста *S. aureus*, *P.aeruginosa*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae* не обнаружен» или «Обнаружен рост *S. aureus*/ *P.aeruginosa*/ бактерий семейства *Enterobacteriaceae*» (С указанием обнаруженного вида микроорганизма).

5 день 17.05.18

Отдел клинико – бактериологических исследований



1. Посев смывов на БГКП
2. Выполняла окраску мазков по Граму для выявления Г+/- палочек/кокков.

Отдел приготовления бактериологических питательных сред

Приготовление питательного бульона для культивирования микроорганизмов на основе гидролизата говяжьего мяса ферментативного «ГМФ-бульон» 30г на 1л дистиллированной воды. И также произвела розлив по пробиркам. (80 шт)



Режимы стерилизации питательных сред

Режим стерилизации	Среды
121 град. С в течение 15 мин.	Тиогликолевая среда, МПА, МПБ, бульон Хоттингера, СПА, СПБ
120 град. С в течение 30 мин.	0,9% раствор NaCl
112 град. С в течение 20 мин.	Среды, содержащие углеводы (среды Гисса), витамины, молоко, желатин
110 град. С в течение 30 мин.	Среда Тароцци
100 град. С в течение 15 мин.	Среды с мочевиной

6 день 18.05.18

Отдел приготовления бактериологических питательных сред

1. Приготовление питательного «бульона Сабуро» - 54 г сухого вещества на 1 л дистиллированной воды. На данной среде выращиваются дрожжевые и плесневые грибы.
2. Приготовление тиогликолевой питательной среды, используемой для контроля стерильности – 31 г препарата размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипячение и розлив в стерильные пробирки и стерилизация автоклавированием при температуре 121 °C в течение 15 минут.

3. Приготовление «Агара Сабуро» - 60 г питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, она предназначена для культивирования грибов.



День 7 21.05.18

Отдел приготовления бактериологических питательных сред

Произведение розлива питательных сред из флаконов в чашки Петри: Агар Сабуро, кровяной агар, ГРМ-1. Маркировка чашек Петри с приготовленной средой и производство учета результатов.

Флаконы и пробирки со средами перед стерилизацией закрывают ватно – марлевыми, целлюлозными или силиконовыми пробками. При необходимости дополнительно закрывают пробки бумажными колпачками. Для предупреждения выбрасывания среды при стерилизации в автоклаве, используют емкость, имеющую объем в 2 – 3 раза, превышающий объем разливаемой среды. Метод и режим стерилизации выбирают в соответствии с требованиями нормативного документа и/или рекомендации производителя. Факт стерилизации питательной среды регистрируют в «Журнале стерилизации питательных сред и растворов». Контроль каждого цикла стерилизации проводят при помощи индикаторов стерилизации химических для соответствующих режимов. После стерилизации определяют pH приготовленной БПС, при необходимости проводят коррекцию pH до значения, указанного на этикетке. Горячую стерильную среду охлаждают до 40-50°C. При необходимости разливают из флаконов в стерильные чашки Петри или пробирки. Розлив простерилизованных сред проводят в боксе розлива питательных сред в помещении 229/3. Перед входом в бокс исполнитель надевает

стерильный халат, шапочку, маску. Производит гигиеническую обработку рук с антисептиком. Далее чашки Петри или пробирки с застывшей питательной средой маркируются (наименование питательной среды, номер партии, дата розлива).



Изучение работы стерилизатора Getinge K+

1. Подготовка пробирок к стерилизации в паровом стерилизаторе Геттинг К7 (режим: 134°C).
2. Загрузка пробирок в паровой стерилизатор настольный Геттинг К7.

8 день 22.05.18

Отдел клинико – бактериологического исследования

Санитарная микробиология

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды проводят в помещениях лечебных организаций в зависимости от их функционального назначения на санитарно-микробиологические показатели, руководствуясь СанПиН 2.1.3.2630-10.

Отбор проб производят:

- на общее количество микроорганизмов (общее микробное число – ОМЧ) в 1 м³ воздуха;
- на наличие *S.aureus* в 1 м³ воздуха.

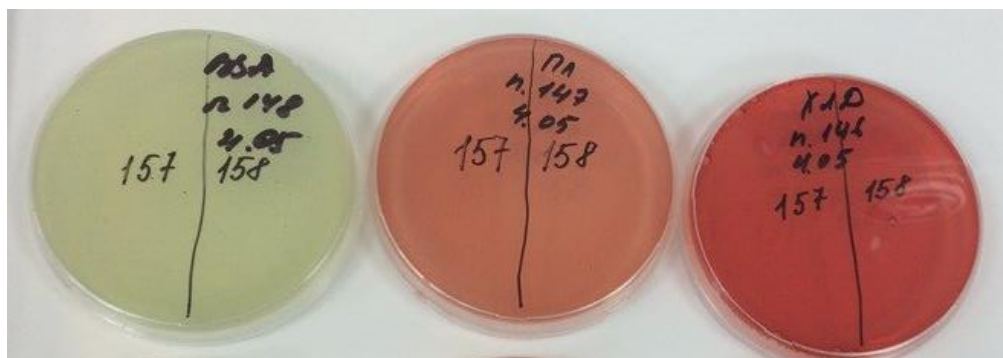
Отбор проб воздуха аспирационным методом производится с помощью аппаратов, приборов и устройств, разрешенных к применению в установленном порядке.



1. При эксплуатации устройства отбора необходимо руководствоваться «Инструкцией по технике безопасности и охране труда при работе с устройством автоматического отбора проб биологических аэрозолей воздуха ПУ-1Б, исполнение 1ЕВКН4.471.014-01», или иным документом в случае применения иного аспирационного устройства.
2. Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм³ (100л) для определения общего количества микроорганизмов.

3. Количество пропущенного воздуха должно составлять 250 дм³ (250л) для определения *S.aureus*.
4. Для определения общего количества микроорганизмов в 1 м³ производится отбор на чашку Петри с питательным агаром типа Среда №1, МПА (мясо-пептонный агар), ГРМ-агар или иным, разрешенным к применению для данного вида исследования.
5. Для определения наличия *S.aureus* в 1 м³ воздуха производится отбор на чашку Петри с питательным агаром типа Среда №10, ЖСА (желточно-солевой агар), или иным разрешенным к применению для данного вида исследования.

Высев проб из селениновой среды обогащения на дифференциально – диагностические питательные среды: Висмут сульфитный агар, среду Плоскирева и XLD, с целью выявления сальмонеллы. (60 шт.)



Отдел приготовления бактериологических питательных сред

1. Подготовка пробирок к стерилизации в паровом стерилизаторе Геттинг К7 (режим: 134°C, 15 мин.)
2. Приготовление бактериологических питательных сред:
 - 1) Мюллер – Хинтон агар

- 2) Приготовление тиогликолевой питательной среды, используемой для контроля стерильности – 16,5 г препарата размешивают в 500 мл дистиллированной воды, кипячение и розлив в стерильные пробирки (84 шт) и стерилизация автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут.
- 3) Загрузка пробирок в паровой стерилизатор настольный Геттинг К7.

9 день 24.05.18 Биохимический тест идентификации энтеробактерий



Приготовление микробной взвеси и раскапывание в пластину биохимически дифференцирующую энтеробактерии. Пластина представляет собой цветовой индикатор. Посев микробной взвеси производился из одной культуры. Система ПБДЭ - пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии предназначена для биохимической идентификации энтеробактерий в течение 18 - 24 ч, представляет собой полимерную пластину с 20 лунками, содержащими высушенные среды с субстратами для 20 тестов. Пластина помещена в полимерный пенал.

Чистую культуру бактерий суспензируют в физиологическом растворе и вносят по 100 мкл суспензии во все лунки пластины, добавляют в соответствующие лунки вазелиновое масло. Пластину в пенале инкубируют при 35 - 37 °С в течение 18 - 24 ч.

10 день 25.05.18

Идентификация и определение биохимических свойств энтеробактерий

Учет результатов биохимического теста производят визуально в соответствии с цветовым указателем (см. таблицу № 1), тем самым дифференцируя энтеробактерии с помощью системы ПБДЭ. По окончании инкубации при температуре (37 ± 0.5) °С. Учет результатов теста на обнаружение β-галактозидазы проводят дважды: через 3-5 ч и через 18-24 ч. так как у некоторых штаммов лимонно-желтое окрашивание через 18-24 ч исчезает.

После окончания инкубации открывают крышку пластины и в лунку для выявления фенилаланиндезаминазы (№ 7) добавляют 1 каплю 10% раствора железа (III) хлорида, в

лунку для определения ацетилметилкарбинола (Nt 9) - I каплю 6% раствора α -нафтола и 1 каплю 40% раствора гидроксида калия, в лунку для выявления индола (№ 8) - 1-3 капли реактива Эрлиха. Выявление ацетилметилкарбинола (№ 9) осуществляют через 15-20 мин после закапывания реактивов.

Идентификацию культур микроорганизмов проводят с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий, диагностического «ключа», кодовой карточки, каталога кодов - пособия для интерпретации результатов идентификации с использованием математического метода классификации.

В культуре №4 была выявлена серологическая идентификация – *Citrobacter* spp.

Таблица № 1
Цветовой указатель

№ лунки и теста	Наименование теста	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	Утилизация цитрата натрия	Темно-зелёный, синий	Желтый, светло-зелёный
2	Утилизация малоната натрия	Темно-зелёный, синий	Желтый, светло-зелёный
3	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	Фиолетовый, бурый	Жёлтый, коричневый
4	Лизиндекарбоксилаза	Темно-зелёный, синий	Желтый, светло-зелёный
5	Аргининдегидролаза	Темно-зелёный, синий	Желтый, светло-зелёный
6	Орнитиндекарбоксилаза	Темно-зелёный, синий	Желтый, светло-зелёный
7	Фенилаланиндезаминаза	Темно-зелёный, синий	Жёлтый
8	Индол	Розовый	Бесцветный
9	Ацетилметилкарбинол	Розовый, малиновый	Бесцветный
10	Уреаза	Малиновый, красный	Жёлтый
11	Сероводород	Черный, темно-серый	Жёлтый
12	Утилизация глюкозы	Жёлтый	Красный
13	Наличие β -галактозидазы	Жёлтый	Бесцветный
14	ут. лактозы	Жёлтый	Красный
15	ут. маннита	Жёлтый	Красный
16	ут. сахарозы	Жёлтый	Красный
17	ут. инозита	Жёлтый	Красный
18	ут. сорбита	Жёлтый, жёлто-оранжевый	Красный
19	ут. арабинозы	Жёлтый, жёлто-оранжевый	Красный
20	ут. мальтозы	Жёлтый	Красный

11 день 28.05.18

Отдел приготовления бактериологических питательных сред

Приготовление БПС

1. Взвешивают необходимое количество сухой питательной среды на весах лабораторных весах ВК, класса точности II.
2. Переносят навеску в емкость для варки сред, объем которой в 2-3 раза превышает окончательный объем готовой среды.
3. Добавляют небольшое количество дистиллированной воды, приготовленной из Аквадистиллятора электрического PSH Aqua 25 и перемешивают.
4. Вливают оставшееся количество воды.
5. Растворение компонентов проводят при постоянном нагревании на электроплите и помешивании. Перегрев среды не допускается.
6. Проводят визуальную оценку питательной среды (цвет, прозрачность, консистенцию и наличие нерастворимых примесей).
7. Измеряют pH среды, при необходимости проводят коррекцию pH с помощью 0,1M раствора гидроксида натрия или 0,1 M раствора соляной кислоты.
8. Фильтруют бульонные среды через бумажный фильтр, агаровые среды - через ватно-марлевый фильтр.
9. Разливают питательные среды во флаконы или пробирки.
10. Флаконы и пробирки со средами перед стерилизацией закрывают ватно – марлевыми, целлюлозными или силиконовыми пробками. При необходимости дополнительно закрывают пробки бумажными колпачками.
11. Метод и режим стерилизации выбирают в соответствии с требованиями нормативного документа и/или рекомендации производителя.
12. Факт стерилизации питательной среды регистрируют в «Журнале стерилизации питательных сред и растворов».
13. Контроль каждого цикла стерилизации проводят при помощи индикаторов стерилизации химических для соответствующих режимов.
14. После стерилизации определяют pH приготовленной БПС, при необходимости проводят коррекцию pH до значения, указанного на этикетке.
15. Горячую стерильную среду охлаждают до 40-50 оС.
16. Разлитые агаровые среды оставляют при комнатной температуре для застывания, после чего убирают в хранилище.

17. В «Журнал приготовления питательных сред» делают соответствующую запись (Приложение 3).
18. Контроль стерильности (чистоты розлива) питательных сред, приготовленных в лаборатории, проводятся для каждой партии.
19. Приготовленные и разлитые в пробирки, флаконы и чашки Петри питательные среды (3% от каждой партии) помещают в термостат (помещение 231, «чистая» зона) и инкубируют в соответствии со сроками, установленными в нормативной документации.
20. Учитывают результат, делают запись в «Журнал контроля чистоты розлива (стерильности) питательных сред» (Приложение 4).
21. При отсутствии роста делают запись «Среда стерильна, пригодна». При наличии роста микроорганизмов делают запись «Не стерильна, не пригодна», партия среды утилизируется.

12 – 14 день 29.05.18 -31.05.18

Ознакомление с серологическими реакциями

Реакция агглютинации.

В этих реакциях принимают участие антигены в виде частиц (микробные клетки, эритроциты и другие корпускулярные антигены), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок. Для постановки реакции агглютинации (РА) необходимы три компонента:

- 1) антиген (агглютиноген);
- 2) антитело (агглютинин);
- 3) электролит (изотонический раствор натрия хлорида).

Ориентировочная реакция агглютинации (РА). Ориентировочная, или пластинчатая, РА ставится на предметном стекле при комнатной температуре. Для этого пастеровской пипеткой на стекло наносят отдельно каплю сыворотки в разведении 1:10 - 1:20 и контрольную каплю изотонического раствора натрия хлорида. В ту и другую бактериологической петлей вносят колонии или суточную культуру бактерий (каплю диагностикума) и тщательно перемешивают их. Реакции учитывают через несколько минут визуально, иногда с помощью лупы (x5). При положительной РА в капле с сывороткой отмечают появление крупных и мелких хлопьев, при отрицательной - сыворотка остается равномерно мутной.

Реакция преципитации в геле.

Чашки заливают агаром, в котором вырезают несколько луночек на равном расстоянии друг от друга. В центральную лунку вносят сыворотку, содержащую антитела, в остальные — различные испытуемые антигены или один и тот же антиген в различных разведениях. При диффузии реагентов в агаре в зонах оптимальных соотношений на месте встречи антигена и антител образуются мутные полосы — дуги преципитации.

Одна из разновидностей реакции преципитации в геле позволяет определять токсигенность исследуемых бактерий (например, дифтерийной палочки) с помощью антитоксической сыворотки. Для этого в чашку Петри на питательную среду помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой. Затем чашку подсушивают в термостате и засевают испытуемыми культурами в виде штрихов, перпендикулярных к полоске бумаги, на расстоянии 0,6-0,8 см от ее края. В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру. Чашки инкубируют при 37°C в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с анитоксином образуются линии преципитации в виде дуг.