

5.06.17

День 1

Сегодня наша бригада пришла на производственную практику по микробиологии в КГБУЗ «Красноярскую краевую бактериологическую лаборатория». В лаборатории мы прошли инструктаж по технике безопасности у заведующей Копытко Людмилы Николаевны. После инструктажа нам провели экскурсию по лаборатории и распределили по отделениям.

Инструктаж

СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

Общие требования

1. Работу с ПБА III-IV групп могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием.
2. При приеме на работу, связанную с использованием ПБА III-IV групп, персонал должен проходить предварительный медицинский осмотр.
3. Все сотрудники бактериологической лаборатории, привлекаемые к работам с ПБА III-IV групп, должны проходить периодические медицинские осмотры, в соответствии с нормативными документами.
4. У сотрудников лабораторий, проходящих ПЦР исследование исследования на гепатиты В и С, ежегодно проводятся контрольные исследования на наличие соответствующих антигенов (антител) в сыворотке крови.
5. Сотрудники, работающие с кровью (сывороткой, плазмой крови), должны быть иммунизированы против вирусных гепатитов.
6. В случае появления у сотрудника симптомов, характерных для инфекционного заболевания, сотрудник должен ставить об этом в известность заведующего бактериологической лабораторией.
7. Все жидкие отходы, образующиеся в процессе работы в «заразной» зоне, подлежат обязательному химическому или термическому обеззараживанию.

Требования к проведению работ в лаборатории

1. Доставка в лабораторию материала осуществляется в контейнерах, биксах или в сумках-холодильниках.
2. Прием и разработка доставляемого материала (проб) на все виды исследований должна проводиться с соблюдением мер предосторожности.
3. Первичная обработка материала на ПЦР исследования должна проводиться только в комнате приема БМ.

4. При пипетировании необходимо пользоваться только резиновыми грушами или автоматическими устройствами.
5. Бактериологическая петля должна быть замкнута в непрерывное кольцо и иметь плечо длиной не более 6 см.
6. Хранение ПБА, их учет, передача, транспортирование и уничтожение проводится в соответствии с требованиями действующих нормативных документов.
7. Использование материалов и средств личной гигиены, раздражающих кожу, не допускается.
8. Прием посетителей, хранение пищевых продуктов, прием пищи разрешается только в специально отведенных местах в «чистой» зоне.
9. В «заразной» зоне не допускается:
 - пипетировать ртом, переливать жидкий инфекционный материал через край сосуда;
 - хранить верхнюю одежду, обувь, зонты, косметику и т.п., а также продукты питания;
 - курить, пить воду;
 - оставлять рабочее место во время работы с ПБА;
 - сливать жидкие отходы без предварительного обеззараживания.

Требования к порядку использования рабочей одежды и средств индивидуальной защиты (СИЗ)

1. Сотрудники лабораторий должны быть обеспечены рабочей одеждой.
2. Рабочая одежда и обувь должны быть индивидуальными.
3. При работе в боксированных помещениях производится смена медицинского халата на противочумный или хирургический.
4. Перемещение одежды из зоны в зону, категорически не допускается.
5. Смена рабочей одежды должна проводиться по мере загрязнения, но не реже одного раза в неделю.
6. Перед сдачей в стирку защитная одежда должна быть обеззаражена.

Приложение (1 день)

Антисептическая обработка рук

Стандартная методика втирания согласно EN 1500



Стадия 1.
Ладонь к ладони, включая запястья



Стадия 2.
Правая ладонь на левую тыльную сторону кисти и левую ладонь на правую тыльную сторону кисти.



Стадия 3.
Ладонь к ладони рук с перекрещенными пальцами



Стадия 4.
Внешняя сторона пальцев на противоположной ладони с перекрещенными пальцами



Стадия 5.
Кругообразное растирание левого большого пальца в закрытой ладони правой руки и наоборот



Стадия 6.
Кругообразное втирание сомкнутых кончиков пальцев правой руки на левой ладони и наоборот

Знакомство с лабораторией.

Микробиологическая лаборатория – это учебное, научное или производственное учреждение, выполняющее экспериментальные, диагностические или производственные работы с патогенными биологическими агентами.

Микробиологическая лаборатория располагается в отдельно стоящем здании. На окнах цокольного и первого этажей установлены металлические решетки.

Лаборатория имеет 2 входа: один – для сотрудников, другой – для доставки материала на исследование.

Помещения лаборатории разделены на «чистую» и «заразную» зону.

К помещениям «чистой» зоны относятся:

- Средоварочная- здесь находятся весы, мерная посуда, рН метр, холодильники. После взвешивания, сухие питательные среды растворяют в дистиллированной воде, доводят до кипения, стерилизуют в автоклаве. Хранение питательных сред осуществляется в холодильниках, шкафах. Среда обязательно должны быть подписаны и указана дата приготовления.
- Автоклавная (стерилизационная) – это комната для проведения стерилизации приготовленных питательных сред. Она оборудована автоклавами.
- Моечная – это комната предназначена для мытья посуды. Она оборудована раковинами.
- Комната медицинского персонала

К помещениям «заразной» зоны относятся:

- Автоклавная – это комната, в которой проводится обеззараживание исследуемого материала.
- Кабинеты бактериологических исследований - предназначена для проведения исследований бактериологическим методом.
- Кабинет приема и регистрации биологического материала.

Рабочие помещения лаборатории светлые, просторные, теплые, снабжены подводкой холодной и горячей воды, электричеством. Стены, потолки и пол имеют гладкую поверхность, легко моющуюся, устойчивую к дезинфектантам. Поверхности рабочих столов также водонепроницаемы, устойчивы к дезинфицирующим веществам.

Приложение (2 день)



7.06.17

День 3

Прием и регистрация биологического материала

Регистрируют БМ в лабораторной информационной системе **qMS**.

ЛИС **qMS** обеспечивает полную автоматизацию технологических процессов современной медицинской лаборатории и поддержку всех видов лабораторных исследований, в том числе микробиологических и гистологических.

Используется ЛИС **qMS** как автономно, так и в составе полнофункциональной медицинской информационной системы **qMS**. Возможна организации работы нескольких лабораторий на единой базе ЦОД (Центр Обработки Данных).

Система масштабируется и легко адаптируется к медицинским лабораториям различного типа, профиля и организационной структуры.

В лаборатории принимают БМ на санитарно-бактериологическое исследование, ПЦР исследование, бактериологическое исследование.

Прием БМ: Медсестра приносит в специальном контейнере БМ с направлениями на анализ, дежурный лаборант сверяет данные в направлении и помещает БМ в контейнер отделения который указан в направлении.



8.06.17

День 4

Средоварка

В лаборатории нас научили варить такие среды, как:

- Физиологический раствор – на 1 литр дистиллированной воды добавляем 10 грамм соли.
- Тиогликолевая среда – 30 гр. среды растворяем в 1 литре дистиллированной воды.
- Бульон Сабуро – 10 гр. пептона смешиваем с 40 гр. глюкозы и добавляем к 1 литру дистиллированной воды.
- Олькеницкого - Препарат в количестве, необходимом для приготовления конкретной серии размешивают в 1 л дистиллированной воды.
- 0,7% полужидкий агар – сухой питательный бульон (15гр.) и микробиологический агар(3гр.) растворить в 1 литре дистиллированной воды.
- Основа питательного агара – к 38 гр. препарата добавляем 1 литр дистиллированной воды.
- Мясопептонный бульон (МПБ) - мясной воде прибавляют 1% пептона и 0,5% х. ч. натрия хлорида

Данные среды нагревают до кипения и разливают по пробиркам (5-7мл.), маркируют, стерилизуют и помещают в холодильные камеры.



9.06.17

День 5

Средоварка

- Кровяной агар - готовится из обычного мясопептонного агара. Агар расплавляют, охлаждают до 42—45°C, добавляют 5% кроличьей крови. Разливают над спиртовкой в чашки Петри равномерным слоем.
- ЖСА - Для приготовления желточно-солевого агара готовят МПА с содержанием 10% хлорида натрия. После разливают во флаконы по 100-200 мл.
- Эндо - МПА (100 мл) растапливают, прибавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в стерильной пробирке в небольшом количестве дистиллированной воды и прокипяченной. Разливают по чашкам Петри.



Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний

Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний проводится в трех основных направлениях:

- 1) поиски возбудителя заболевания в материале, взятом у больного (испражнения, моча, мокрота, кровь, гнойное отделяемое и др.);
- 2) обнаружение специфических антител в сыворотке крови — серологическая диагностика;
- 3) выявление повышенной чувствительности организма человека к возбудителям инфекционных заболеваний — аллергический метод.

1. Для выявления возбудителя инфекционного заболевания и его идентификации (определения вида возбудителя) используют три метода: микроскопический, микробиологический (бактериологический) и биологический.

- Микроскопический метод позволяет обнаружить возбудителя непосредственно в материале, взятом у больного. Этот метод имеет решающее значение при диагностике гонореи, туберкулеза, заболеваний, вызываемых простейшими: малярии, лейшманиозов. Возможности микроскопического метода при этих инфекциях обусловлены значительными морфологическими различиями возбудителей данных заболеваний. Однако микроскопический метод не позволяет поставить диагноз при таких инфекциях, как, например, брюшной тиф и паратифы, дизентерия. Для того чтобы различить сходные между собой по морфологии микроорганизмы, их надо получить в чистой культуре и идентифицировать, что можно сделать с помощью микробиологического метода исследования.
- Микробиологический метод заключается в посеве исследуемого материала на питательные среды, выделении чистой культуры возбудителя и его идентификации.
- Биологический метод осуществляют путем выделения возбудителя заболевания или его токсина при заражении лабораторных животных, восприимчивых к данному заболеванию. Идентификацию выделенного возбудителя проводят до вида (типа), используя бактериологический метод. Биологический метод используют также при определении вирулентности возбудителей.

2. Серологические методы диагностики инфекционных заболеваний основаны на выявлении специфических иммунных антител в сыворотке крови больного. Для этого используют различные иммунологические реакции: реакцию агглютинации при брюшном тифе (Видаля), реакцию Райта при бруцеллезе, реакцию связывания комплемента (Вассермана) при сифилисе, реакцию непрямой гемагглютинации при многих инфекционных заболеваниях, реакцию нейтрализации и торможения гемагглютинации при вирусных заболеваниях.
3. Аллергический метод позволяет поставить диагноз инфекционного заболевания с помощью аллергических проб — накожных и внутрикожных. Метод выявляет повышенную чувствительность замедленного типа, возникающую в организме при многих инфекционных заболеваниях. Введение аллергена накожно или внутрикожно используют для диагностики бруцеллеза, туляремии, токсоплазмоза и других заболеваний.

Для того чтобы правильно поставить диагноз инфекционного заболевания, чаще всего используют комплекс всех лабораторных методов: выделение возбудителя, определение антител в крови больного и выявление повышенной чувствительности замедленного типа.



14.06.17

День 7

Дисбактериоз. Этапы исследования

Дисбактериоз — это состояние, при котором изменяется состав микроорганизмов, населяющих кишечник (полезных бактерий становится меньше, а вредных, соответственно, больше), что приводит к нарушению работы желудочно-кишечного тракта.

Методика исследования кала на дисбактериоз.

Исследуются испражнения больных (5-10 г), которые собирают в стерильные баночки. Консервант к испражнениям не добавляется. Собранный материал следует немедленно доставить в лабораторию и до посева хранить в холодильнике, но не более 4 ч. Особенно важно сбор материала проводить до начала антибактериального лечения.

Для выявления анаэробной микрофлоры рекомендуется разводить испражнения физиологическим раствором в 10 раз. Из этого основного разведения делают ряд последующих (1: 100, 1: 1000, 1: 10000, 1: 100000). Из последнего разведения делают посева по 0,1 мл на среды Эндо, Левина, Сабуро, Плоскирева, кровяной агар и др. Количество кишечной палочки и других микробов в 1 г фекалий определяют по числу колоний, выросших на соответствующей питательной среде с пересчетом на количество посеянного материала и степень его разведения.

На 5% кровяном агаре учитывают процентные соотношения между колониями, обладающими и не обладающими гемолизирующими свойствами. Палочку протей легко обнаружить в посевах на агаре по Шукевичу (H-форма) или среде Ресселя с мочевиной - окрашивание в фиолетово-коричневый цвет при индикаторе тимоловый синий с добавлением кислого фуксина. Чашки со средой Сабуро выдерживают в термостате в течение 3-5 дней, затем плотные колонии пересевают в среду с солодовым суслем и также помещают в термостат на 3-4 дня. При исследовании нативного препарата можно видеть длинные или короткие нити мицелия, характерные для патогенных дрожжеподобных грибов.

Иммунодиагностика

1. Реакция агглютинации- склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии электролитов - натрия хлорида.

Развернутая реакция агглютинации с сывороткой крови. К разведениям сыворотки добавляют диагностикум.

- Агглютинация с О-диагностикумом (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие О- антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.
- Агглютинация с Н - диагностикумом (бактерии, убитые формалином, сохранившие жгутиковый Н-антиген) - крупнохлопчатая и протекает быстрее.

2. Реакция преципитации- это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах, избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.

Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. Широкое распространение получили разновидности реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.

3. Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), тем 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 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).

4. Реакция иммунофлюоресценции - РИФ. Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом. РИФ является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.

- Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.
- Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимицробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимицробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

Утилизация, дезинфекция и стерилизация

Стерилизация – полная инактивация 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, нагреваемый с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 160°C 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 120°C. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2 атм – 121°C – 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 130-150°C).

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. Различают 3 основных метода дезинфекции: тепловой, химический, УФ-облучение.

Приложение (9 день)

