День 1

**Устройство бактериологической лаборатории.**

Бактериологическая лаборатория предназначена для исследования материалов, содержащих возбудителей бактериальных инфекций, для определения санитарно-микробиологических показателей, контроля состояния и напряженности специфического иммунитета и других микробиологических исследований. Бактериологическая лаборатория должна размещаться в изолированных от других лабораторий помещениях с необходимым оборудованием и мебелью. Лаборатория должна иметь отдельный вход, гардероб и душевую. В состав бактериологической лаборатории должны входить следующие помещения:

- комната приема и регистрации материалов;

- боксированные помещения для микробиологических исследований;

- автоклавная;

- моечная.

Комнаты для микробиологических исследований оборудуют термостатами, холодильниками, центрифугами, весами, водяными банями, электромагнитными мешалками. Работу с инфицированным материалом проводят в боксе с предбоксником. У входа в бокс должен быть коврик, пропитанный дезраствором. В боксе разбирают поступившие пробы, готовят и фиксируют мазки-отпечатки, проводят посевы микроорганизмов на питательные среды. Поэтому в боксе располагают столы, на которых размещают необходимые для работы инструменты: емкости с дезрастворами для использованной посуды, штативы для пробирок, пробирки и чашки Петри с питательными средами, стерильные пипетки, ступки и т. д. В предбокснике в биксах необходимо иметь стерильные халаты, шапочки, маски, а также в предбокснике должна быть сменная обувь. В боксах и предбоксниках ежедневно проводят влажную уборку, дезинфекционную обработку и облучение с помощью бактерицидных ламп в течение 30-40 минут перед началом работы и после работы.

В автоклавной необходимо иметь два автоклава: один автоклав для чистых материалов (для стерилизации посуды, питательных сред, инструментов); другой автоклав для инфицированных материалов (для обезвреживания инфицированных инструментов и материалов).

Моечная предназначена для мытья посуды. Посуду, пипетки и инструменты, загрязненные инфицированным материалом, моют только после стерилизации. В ней размещают сушильные шкафы.

Правила работы в бактериологической лаборатории.

Сотрудники лаборатории обязаны соблюдать следующие правила:

1. Работать разрешается в специальной одежде – халате и шапочке. В боксе работают в стерильном халате, маске, шапочке, при необходимости надевают резиновые перчатки и очки. Обязательно меняют обувь.

2. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнюю одежду на халат.

3. В лаборатории запрещается курить и принимать пищу.

4. Весь материал, поступающий в лабораторию на анализ, должен рассматриваться как инфицированный. Поэтому при распаковке материала необходимо соблюдать осторожность. Емкости следует обтирать снаружи дезинфицирующим раствором и ставить их на подносы или в кюветы.

5. В случае попадания инфицированного материала на халат, руки, стол, обувь необходимо провести дезинфекцию и сообщить об этом заведующему лабораторией.

6. Зараженный материал обязательно уничтожают автоклавированием. Инструменты, а также поверхность рабочего стола после работы дезинфицируют.

7. Запрещается выносить из лаборатории оборудование, инвентарь, материалы без предварительной их дезинфекции.

8. Пипетки, предметные и покровные стекла и другую посуду, бывшую в употреблении, обеззараживают, погружая в дезраствор.

9. По окончании работы рабочее место приводят в порядок и тщательно дезинфицируют. Культуры микроорганизмов, необходимые для дальнейшей работы, убирают на хранение в холодильник.

В бактериологической лаборатории ведется следующая документация:

1. Инвентарная книга музейных штаммов культур.

2. Журнал учета движения материала в лаборатории.

3. Журнал учета стерилизации и уничтожения инфицированного материала.

4. Журнал учета зараженных подопытных животных.

5. Журнал исследований (экспертиз).

На каждом рабочем месте должна быть укомплектована аптечка первой помощи.

1. О каждом случае повреждения, связанного с возможностью загрязнения кровью и др. биологическими жидкостями при выполнении своих обязанностей, ставить в известность заведующего отделением и старшего лаборанта. Регистрировать их в журнале регистрации несчастных случаев, хранящихся на раб. месте.

2. В случае оказания мед. помощи, персонал, получивший травмы кожи или загрязнения слизистых биоматериалом пациента, расценивается как «медицинский контакт». Если пациент известен, его при возможности необходимо обследовать на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С.

Нормативный документ:

**СП 3.1.5.2826-10 от 11 января 2011 г Санитарно-эпидемиологические правила "Профилактика ВИЧ-инфекции.**

Содержание аптечки:

1. 70% спиртовой раствор - флакон 50 мл.

2. 5% спиртовой раствор йода - флакон 10 мл.

3. раствор сульфацида натрия 20%-2 флакона по 5 мл.

4. стерильный бинт – 1шт.

5. лейкопластырь – 1 шт.

6. шприц одноразовый 2 мл. – 2 шт.

7. стерильные салфетки.

8. перчатки 2 пары.

9. Экспресс тесты для диагностики ВИЧ и гепатита «С»

10.Ретровирусные препараты.

В первый день практики я ознакомилась с правилами техники безопасности в КДЛ, показали и рассказали о лаборатории, о внутренних порядках и ее устройствах.

Расписалась за технику безопасности в журнале.

День 2 – 3

**Подготовка материала к микробиологическим исследованиям: прием и регистрация материала.**

Материалом для микробиологических исследований служат чаще всего выделения человека (испражнения, моча, рвотные массы, мокрота, отделяемое ран), а также кровь, желчь, спинномозговая жидкость, промывание воды желудка, бронхов, трупный (секционный) материал.

Регистрируют материал в журналы и в электронную базу данных (qms).





День 4 – 5

**Техника приготовления основных питательных сред.**

Для культивирования микробов в лабораторных условиях готовят питательные среды с учетом потребности в питательных веществах каждого вида в отдельности. Питательная среда в своем составе должна содержать углерод, водород, кислород, азот, фосфор, серу, магний, железо, микроэлементы и биостимуляторы роста.

Различают питательные среды естественные (молоко, яйца, шоколад и т. п.), искусственные, приготовленные из продуктов животного или растительного происхождения, и синтетические (среды Чапека, Сабуро). По консистенции среды могут быть жидкими, полужидкими и плотными.

Для приготовления плотных сред в жидкие среды добавляют агар-агар или желатин. Агар-агар представляет собой продукт переработки высушенных морских водорослей рода анфельция, состоящий в основном из полисахаридов. В холодной воде агар-агар набухает и размягчается, в горячей (90—100° С) расплавляется, образуя клееобразную массу. Застывает агар-агар при 40° С, образуя студень. Как питательное вещество агар-агар микробами не используется.

Желатин получают путем вываривания кожи, костей и сухожилий животных. При нагревании с водой желатин образует коллоидный раствор, застывающий при 18—20° С в однородный коллоидный студень и расплавляющийся при 25—27° С.

В бактериологической практике обычно применяют среды из продуктов животного и растительного происхождения, содержащие пептоны, экстрактивные вещества мяса, кровь, сыворотку, сусло, углеводы и т. п.

Питательные среды должны быть стерильными (должно быть обеспечено получение чистых культур микроорганизмов), прозрачными (выросшие на них микроорганизмы должны быть хорошо видны и иметь определенную величину рН).

Хранят готовые среды в прохладном месте, в плотно закрывающихся шкафах или ящиках, что предохраняет их от быстрого высыхания. Надолго хранившихся средах микробы развиваются слабо или совсем не растут.

Питательные среды принято делить на три группы:

1) стандартные (универсальные) — предназначаются для культивирования большинства микробов;

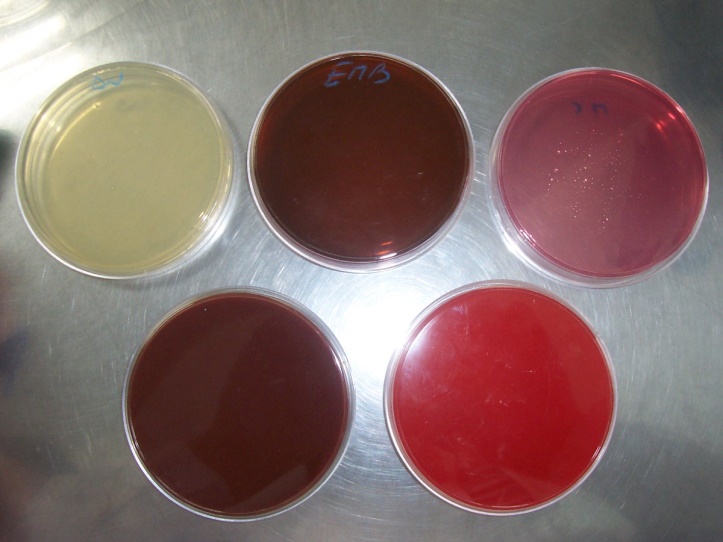
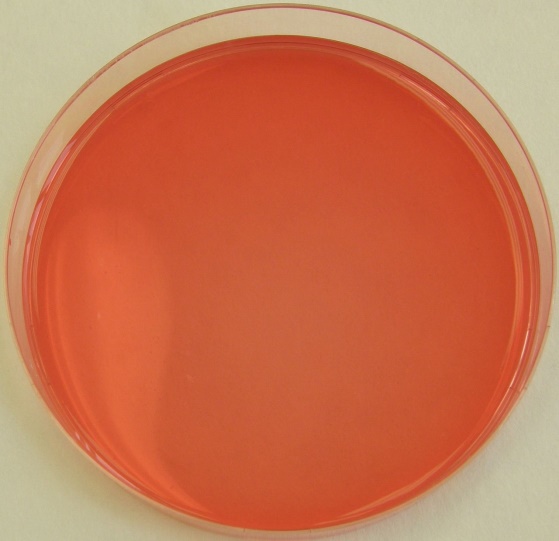
2) специальные элективные, избирательные — предназначаются для выращивания только определенного вида микробов, рост других микроорганизмов на этих средах подавляется;

3) дифференциально-диагностические — предназначаются для изучения биохимических свойств микробов с целью дифференцирования различных видов микроорганизмов.

Стандартные питательные среды: МПА (мясопептонный агар), МПБ (мясопептонный бульон).

Специальные (элективные) питательные среды: Среды для выращивания анаэробных микробов. Мясопептонный печеночный бульон Кита - Тароцци (МППБ), Полужидкий агар для анаэробов, Сывороточный агар, Капустная среда и др.

Дифференциально-диагностические (цветные) питательные среды : Среда Эндо, среда Гисса, среда Кесслера.





День 6 – 7

Важным этапом бактериологического исследования является посев. В зависимости от цели исследования, характера посевного материала и среды используют разные методы посева. Все они включают обязательную цель: оградить посев от посторонних микробов. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, усиливающих колебания воздуха. Во время посевов нельзя разговаривать. Посевы лучше делать в боксе.

Методы посевов.

1. Посев из пробирки в пробирку.
2. Посев на пробирки с чашки Петри.
3. Посев на агар в чашки Петри.

Анализ мочи на бактериологический посев.

Тщательно вымыть руки мыльной водой, насухо вытереть их чистым (желательно одноразовым) полотенцем. Произвести туалет наружных половых органов с использованием теплой мыльной воды, без использовании кожных антисептиков, просушить паховую область чистой одноразовой салфеткой. Открыть заранее подготовленный стерильный контейнер, избегая дотрагиваться пальцами до его внутренних поверхностей. Выпустить первую порцию мочи остановить мочеиспускание. Следующую (среднюю) порцию собрать в подготовленный стерильный контейнер, не касаясь емкостью кожных покровов в паховой области. Завершить мочеиспускания мочеиспускание в унитаз. Плотно закрыть крышку заполненного контейнера, подписать, прикрепить к контейнеру направление на анализ тонкой резинкой, доставить его в лабораторию.

Далее после доставки материала в лаборатории

1. регистрировать в базу данных,
2. в вытяжном шкафу зажигают спиртовку
3. посев делают на чашках Петри с кровяным и уробилиновым агаром
4. чашку Петри делят на 4 части
5. сначала обжигают петлю, берут материал и делают посев волнистыми движениями
6. ставят чашки Петри в термостат на 24 часа

День 8 – 9

**Окраска по Граму**

Техника окраски. На фиксированный жаром мазок кладут полоску фильтровальной бумаги величиной немного короче и уже предметного стекла, наливают на нее достаточное количество раствора кристаллвиолета, карболового или же анилинового раствора генцианвиолета, или другой какой-либо фиолетовой трифенилметановой краски (напримep метилвиолета) на 1—2 минуты. Затем краску сливают, удаляют полоску фильтровальной бумаги и, не смывая водой, наливают на мазок раствор Люголя на 1—2 минуты. Раствор сливают и обесцвечивают препарат в 96° спирте в течение 30—60 секунд, промывают водой и окрашивают дополнительно фуксином Пфейффера (или разведенным сафранином, нейтральротом или везувином) в течение 2—3 минут. Затем краску смывают водой, а мазок высушивают чистой фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: при правильной окраске мазков по Граму грамположительные микробы будут окрашены в темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные — в цвет дополнительной краски (например, в розовый цвет фуксина Пфейффера).



День 10 – 11

**Дисбактериоз. Этапы исследования.**

Дисбактериоз – изменение количественного соотношения и состава нормальной микрофлоры организма, главным образом его кишечника, при котором происходит уменьшение количества или исчезновение обычно составляющих ее микроорганизмов и появление в большом количестве редко встречающихся или несвойственных ей микробов.

Посевы изучают на наличие патогенных микроорганизмов и на нарушение соотношения различных видов микробов. Результаты исследования следует считать объективными при анализе роста изолированных колоний в том числе, если можно изучить морфологию и подсчитать количество колоний на чашку Петри. После идентификации проводят пересчет содержания микроорганизмов каждого вида на 1 г исследуемого материала. При обнаружении патогенной микрофлоры необходимо изучить ее чувствительность к антибактериальным препаратам и бактериофагам.

Отбор и доставка материала на дисбактериоз:

Материалом для исследования является кал не позже 2 часов после дефекации.

Для получения достоверного результата стул должен быть обязательно утренним, самостоятельным, не на фоне лечения. У грудных детей забирать материал не с памперсов и пеленок.

Одну столовую ложку фекалий помещают в прокипяченную стеклянную баночку.

Лабораторная диагностика дисбактериоза кишечника

Метод исследования - бактериологический: мерный посев исследуемого материала с целью определения количества микроорганизмов наиболее значимых групп.

Этапы исследования:

* приготовление серийных разведений суспензии испражнений;
* посев на питательные среды из разведений;
* учет результатов посева и ориентировочная идентификация микроорганизмов;
* оценка результатов.

День 12 – 13

**Иммунодиагностика РА, РП, РСК, РИФ, РСК,ПЦР**

Реакция агглютинации (РА). В этой реакции принимают участие антигены в виде частиц (микробные клетки, эритроциты и другие корпускулярные антигены), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок. В зависимости от вида используемого иммунодиагностикума различают реакцию микробной агглютинации, гемагглютинации, латексагглютинации, коаглютинации и т.д. Для диагностики инфекционных заболеваний реакцию агглютинации проводят в двух направлениях: определяют вид выделенного от больного микроба-возбудителя с помощью диагностической агглютинирующей сыворотки (серологическая идентификация микроба) и обнаруживают специфические антитела в сыворотке больного, используя стандартный микробный диагностикум (серодиагностика заболевания, постановка серологического диагноза).

Реакция преципитации (РП) – это осаждение растворимого антигена при действии антител в присутствии электролита. Видимый эффект реакции (феномен преципитации) – помутнение (образование мутного кольца или осадка – преципитата). РП применяют для обнаружения неизвестного антигена при ряде инфекционных заболеваний: при сибирской язве, туляремии, менингите, оспе. В судебной медицине ее используют для определения видовой принадлежности крови, спермы; в санитарно-гигиенических исследованиях – для установления фальсификации пищевых продуктов. РП отличается очень высокой чувствительностью и позволяет обнаружить антиген в разведении 1:1 000 000 и 1: 10 000 000.

Реакция связывания комплемента (РСК). В РСК помимо антигена и антител принимает участие третий компонент - комплемент, который способен связываться с комплексом антиген-антитело. Образование комплексов антиген-антитело и фиксация комплемента не сопровождаются видимыми изменениями. Для обнаружения связывания комплемента используют дополнительную индикаторную гемолитичесчкую систему (эритроциты барана, обработанные гемолитической антисывороткой). В присутствии комплемента (сыворотки морской свинки) происходит лизис эритроцитов. Если в опытной системе образовались комплексы антиген-антитело, которые связывают комплемент, то лизис эритроцитов в индикаторной системе не произойдет (реакция положительная). РСК используется при определении антител к вирусу Коксаки, при лабораторной диагностике сифилиса - реакция Вассермана.

Реакция иммунной флюоресценции (РИФ) основана на том, что иммунные сыворотки обрабатывают флюорохромами (ФИТЦ), которые соединяются с антителами. Сыворотки при этом не теряют своей иммунной специфичности. При взаимодействии полученной люминесцентной сыворотки с соответствующим антигеном образуется специфический светящийся комплекс, легко видимый в люминесцентном микроскопе.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод умножения числа копий нуклеиновых кислот (амплификация) in vitro. Перед проведением реакции из биологического материала выделяют ДНК или РНК возбудителя инфекционного заболевания или ДНК генома клеток человека. Полимеразная цепная реакция проводится с использованием двух или более олигонуклеотидных праймеров («затравки»), фланкирующих участок ДНК (РНК), специфический для определяемого участка генома. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК в каждом последующем цикле. Как правило, проводится не менее 30 последовательных циклов реакции. Амплифицированный учасок именуют «ампликоном». В результате реакции происходит экспоненциальное увеличение количества копий специфического фрагмента. При амплификации используется термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из бактерий Thermus aquaticus (Taq), живущих в горячих источниках.

День 14 – 15

**Санитарно-бактериологическое исследование воздуха, смывов.**

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха проводят в плановом порядке: в больницах, операционных, детских учреждениях и др.

При санитарно-бактериологическом исследовании определяют:

1. Общее количество бактерий в 1 м3 воздуха.

2. Наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в 1 м3 воздуха.

Выявление микроорганизмов в воздухе проводится при помощи специальных приборов и специальных сред (диагностических и дифференциально-диагностических).

Методы отбора проб воздуха

Существуют два основных способа отбора проб воздуха для исследования: 1) седиментационный - основан на механическом оседании микроорганизмов; 2) аспирационный - основан на активном просасывании воздуха (этот метод дает возможность определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий).

Седиментационный метод

Чашки Петри с питательной средой (МПА) устанавливают в открытом виде горизонтально, на разном уровне от пола. Метод основан на механическом оседании бактерий на поверхность агара в чашках Петри. Чашки со средой экспонируют от 10 до 20 мин, в зависимости от предполагаемого загрязнения воздуха. Для выявления патогенной флоры используют элективные среды. Экспозиция в этих случаях удлиняется до 2-3 ч. После экспозиции чашки закрывают, доставляют в лабораторию и ставят в термостат на 24 ч при температуре 37° С. На следующий день изучают выросшие колонии. Метод этот используют в основном в закрытых помещениях.

Аспирационный метод

Прибор Дьяконова также основан на улавливании бактерий в жидкости, через которую пропущен воздух.

Прибор ПАБ-1 предназначен для бактериологического исследования больших объемов воздуха в течение короткого промежутка времени. Получение проб воздуха производят со скоростью 125-150 л/мин. Принцип работы прибора основан на улавливании микроорганизмов на электрод противоположного заряда. Большая скорость отбора проб воздуха в этом приборе и возможность посева его на различные питательные среды имеет значение для обнаружения патогенных и условно-патогенных бактерий (например, синегнойной палочки в хирургических отделениях и др.).

Аппарат Кротова. Действие основано на принципе удара струи воздуха на среду в чашках Петри. Аппарат состоит из трех частей: узла для отбора проб воздуха, ротаметра, электрической части питающего механизма.

Исследуемый воздух при помощи центробежного вентилятора, вращающегося со скоростью 4000-5000 об/мин, засасывается в щель прибора и ударяется о поверхность открытой чашки Петри со средой. Содержащиеся в воздухе микроорганизмы оседают на питательный агар. Для равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности столик с находящейся на нем чашкой вращается. Из прибора воздух выводится через воздухопроводную трубку, которая соединена с ротаметром, показывающим скорость протягивания воздуха через прибор.

Недостатком прибора Кротова является то, что он нуждается в электроэнергии, поэтому не во всех условиях может быть использован.

Санитарно-бактериологическое исследование смывов

Для оценки санитарно-гигиенического состояния предприятий общественного питания, предприятий пищевой промышленности, лечебно-профилактических и детских учреждений проводят исследование смывов с рук персонала и предметов окружающей обстановки.

В зависимости от цели исследования определяют:

1. Наличие БГКП.

2. Наличие S. aureus.

3. Общее количество бактерий.

Исследования на патогенную микрофлору проводят только по эпидпоказаниям.

На предприятиях общественного питания и в детских учреждениях исследования обычно ограничивают выявлением БГКП (как показатель фекального загрязнения) и S. aureus.

В отделениях хирургического профиля (операционных, отделениях реанимации, интенсивной терапии и т. д.), кроме вышеуказанных показателей, определяют количественную обсемененность микроорганизмами, наличие синегнойной палочки и протея.

Отбор проб. Взятие проб осуществляют методом смывов. Используют ватные тампоны (палочка с намотанной на нее ватой вставлена в пробирку) или салфетки 5×5 см, которые захватывают стерильным пинцетом. Тампоны и салфетки увлажняют, помещая их в пробирки с 2 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Смывы с рук делают в следующей последовательности: начинают с левой руки, с участков меньшей загрязненности - протирают тыльную сторону руки от кисти к пальцам, затем ладонную сторону, между пальцами и под ногтевым ложем. Этим же тампоном в такой же последовательности производят смывы с правой руки.

Смывы с предметов обихода при контроле больших поверхностей делают из нескольких мест. Исследуемые участки ограничивают рамкой трафарета площадью 50×50 или 100×100 см2. Трафарет изготовляют из проволоки и перед употреблением прожигают над пламенем горелки.

Смывы, как правило, берут с чистых, подготовленных к работе предметов, а с бывших в употреблении - только по эпидпоказаниям.

День 16 – 17

**Утилизация. Дезинфекция. Стерилизация.**

Классификация медицинских отходов:

Медицинские отходы в зависимости от степени их эпидемиологической, токсикологической и радиационной опасности, а также негативного воздействия на среду обитания подразделяются на пять классов опасности:

класс А - эпидемиологически безопасные отходы,

класс Б - эпидемиологически опасные отходы;

класс В - чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы;

класс Г - токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности;

класс Д - радиоактивные отходы.

Класс опасности Характеристика морфологического состава

Класс А (эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО) – отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными (канцелярские принадлежности, упаковка, мебель, инвентарь, потерявшие потребительские свойства. Смет от уборки территории и так далее. Пищевые отходы центральных пищеблоков, а также всех подразделений организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, кроме инфекционных, в том числе фтизиатрических)

Класс Б (эпидемиологически опасные отходы) Инфицированные и потенциально инфицированные отходы. Материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями. Патолого-анатомические отходы. Органические операционные отходы (органы, ткани и так далее). Пищевые отходы из инфекционных отделений.

Отходы из микробиологических, клинико-диагностических лабораторий, фармацевтических, иммунобиологических производств, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Биологические отходы вивариев.

Живые вакцины, непригодные к использованию

Класс В (чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы) Материалы, контактировавшие с больными инфекционными болезнями, которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и требуют проведения мероприятий по санитарной охране территории. Отходы лабораторий, фармацевтических и иммунобиологических производств, работающих с микроорганизмами 1-2 групп патогенности. Отходы лечебно-диагностических подразделений фтизиатрических стационаров (диспансеров), загрязненные мокротой пациентов, отходы микробиологических лабораторий, осуществляющих работы с возбудителями туберкулеза

Класс Д (токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности) Лекарственные (в том числе цитостатики), диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию.

Ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование. Отходы сырья и продукции фармацевтических производств. Отходы от эксплуатации оборудования, транспорта, систем освещения и другие

Класс Г(радиоактивные отходы) Все виды отходов в любом агрегатном состоянии, в которых содержание радионуклидов превышает допустимые уровни, установленные нормами радиационной безопасности**.**

Дезинфекция и стерилизация

Дезинфекция и стерилизация изделий медицинского назначения проводится с целью уничтожения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов - вирусов (в т. ч. возбудителей парентеральных вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции), бактерий (включая микобактерии туберкулеза), грибов на изделиях медицинского назначения, а также в их каналах и полостях. Дезинфекции подлежат все изделия после применения их у пациента. Стерилизации подлежат все изделия, соприкасающиеся с раневой поверхностью, контактирующие с кровью в организме пациента или вводимой в него, инъекционными препаратами, а также изделия, которые в процессе эксплуатации контактируют со слизистой оболочкой и могут вызвать ее повреждение. Дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизация изделий медицинского назначения (далее изделия) направлена на профилактику внутрибольничных инфекций у пациентов и персонала лечебно-профилактических учреждений.

Нормативный документ :

**СанПиН 2.1.2790-10 от 09.12.2010 « Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».**

****