

Инструктаж по технике безопасности

К работе в бактериологической лаборатории допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинский осмотр, инструктаж по охране труда и пожарной безопасности.

Обязанности при работе:

- Соблюдение правил внутреннего трудового распорядка;
- Соблюдение режимов труда и отдыха;
- Немедленное извещение заведующей отделением о ситуации, угрожающей жизни и здоровью;
- Выполнение требований нормативных документов, инструкций по охране труда, правил пожарной безопасности;
- Выполнение требований личной гигиены, содержание в чистоте рабочего места;

Необходимо руководствоваться принципом, что все пациенты потенциально инфицированы.

При работе в лаборатории необходимо использовать специальную одежду, сменную обувь, шапочку, средства индивидуальной защиты (фартук прорезиненный, перчатки, нарукавники, очки защитные, маска). После любой процедуры двукратно тщательно моют руки и дезинфицируют их.

При транспортировке биоматериала соблюдают следующие правила:

- Емкости с биоматериалом плотно закрывать пробками;
- Биоматериал транспортировать в штативах, поставленных в контейнеры, биксы или пеналы (на дно помещают салфетку)

- Не вкладывать бланки и другую документацию в пробирки.

Заполняют всю документацию на чистом столе.

Запрещено:

- Использовать покрытие лаком для ногтей, искусственные ногти, ювелирные украшения;
- Работать с неисправным оборудованием;
- Оставлять включенным в сеть приборы, за исключением некоторых, которые могут находиться в круглосуточном режиме работы;
- Есть в неподобающем месте;
- Пипетировать ртом;
- Переливать кровь, сыворотку через край пробирки.

По окончании работы инструменты и перчатки поместить в контейнер для обеззараживания, поверхности столов обработать дезсредством, провести влажную уборку кабинета, кварцевание и проветривание.

Подпись _____

1 день.

Ознакомилась с безопасностью в Бактериологической лаборатории.

Правила поведения и работы в Бактериологической лаборатории:

1. К работе в бактериологической лаборатории допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинский осмотр, инструктаж по охране труда и пожарной безопасности;
2. К работе допускают сотрудников только после ознакомления с правилами поведения и режимом работы;
2. Все работники подвергаются профилактическим прививкам, главным образом против кишечных инфекций;
3. Каждый сотрудник имеет халат и шапочку; в лаборатории носят сменную обувь;
4. Каждый сотрудник обязан строго соблюдать личную гигиену, содержать в чистоте рабочее место;
5. Поступающий в лабораторию материал регистрируют в специальный журнал, присваивают свой штрих-код и маркируют;
6. Весь поступающий материал для исследования считают инфицированным (заразным). Его ставят на специальный поднос, а емкость с материалом протирают дезинфицирующим раствором снаружи;
7. Переливать исследуемый материал из одной емкости в другую следует над дезинфицирующим раствором;
8. При попадании исследуемого материала на руки, стол или другие предметы их обрабатывают дезинфицирующим раствором;

9. По окончании работы инструменты и перчатки поместить в контейнер для обеззараживания, поверхности столов обработать дезсредством, провести влажную уборку кабинета, кварцевание и проветривание. Генеральная уборка проводится 1 раз в 7 дней в боксе и стерилизационной, 1 раз в месяц – в остальных помещениях лаборатории. Культуры обезвреживают или, при необходимости, сохраняют в холодильнике. Материал, требующий продолжения исследования, ставят в термостат;

10. В лаборатории категорически запрещается принимать пищу и курить.

Утилизация отходов происходит согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами: в лаборатории утилизируют отходы класса А (неопасные отходы, не контактировавшие с больными - белый пакет или другого цвета, кроме желтого и красного) и отходы класса Б (опасные отходы с возможным инфицированием - желтый пакет). Контейнеры для утилизации маркируются.

Состав аптечки:

1. 70% спиртовой раствор – 100 мл
2. 5% спиртовой раствор йода – 10 мл
3. Раствор сульфацила натрия 20% - 2 флакона по 5 мл
4. Раствор протаргола 1% - 10 мл
5. Стерильный бинт – 1 шт
6. Лейкопластырь – 1 шт

7. Шприц одноразовый 2 мл – 2 шт

8. Стерильные салфетки

9. Перчатки – 2 пары

При загрязнении перчаток биоматериалом убрать загрязнения тампоном с дезраствором. Снять перчатки и погрузить их в дезраствор, затем утилизировать. Руки вымыть и обработать антисептиком.

В случае порезов или уколов снять перчатки, сбросить в дезраствор, вымыть руки с мылом, обработать руки 70% спиртом, кожу вокруг раны 5% раствором йода.

При попадании биоматериала на кожные покровы обработать 70% спиртом, обмыть проточной водой с мылом и повторно обработать 70% спиртом.

При попадании биоматериала на слизистую носа – слизистую промыть водой, не тереть и закапать 1% раствор проторгола; на слизистую глаз – обильно промыть водой, не тереть, закапать 20% сульфацила натрия; на слизистую рта - промыть рот большим количеством воды и прополоскать 70% раствором этилового спирта.

При попадании биоматериала на одежду – снять ее и погрузить в дезраствор или бикс для автоклавирования.

План ликвидации аварий при работе с патогенными биологическими агентами:

Все случаи аварий, микротравм и травм и принятые меры подлежат регистрации в специальном журнале.

1. Авария с разбрызгиванием ПБА:

Это аварии с образованием аэрозоля (бой пробирок, флаконов, колб с жидкой культурой, бой чашек и пробирок с культурами на агаре с конденсатом, разбрызгивание бактериальной суспензии из пипетки и другие).

Порядок действий:

1. Всем лицам в помещении прекратить работу, задержав дыхание, выйти из помещения, плотно закрыть дверь, сообщить руководителю подразделения;

2. Руки обработать дезраствором, незащищенное лицо обильно обработать 70% этиловым спиртом;

3. Слизистые глаз, носа и рта обработать препаратами из аварийной аптечки;

4. Защитную одежду снять, погрузить в дезраствор;

5. Открытые части тела протереть антисептиком;

6. Принять душ, надеть чистую рабочую одежду.

Проведение дезинфекционных мероприятий:

- Применяют дезраствор, эффективный в отношении возбудителя;

- Через 2 ч после первичной обработки собирают тампонами с дезраствором осколки посуды и погружают их в емкость с дезраствором, посуду с посевами погружают в емкость с дезраствором или обтирают салфеткой с дезраствором и погружают их в емкость для автоклавирования;

- Воздух и поверхности обеззараживают бактерицидными лампами;
- Сотрудник, проводивший дезинфекцию, выходит в коридор, снимает одежду, помещает ее в дезраствор;
- Через 2 ч. убирают помещение, после чего работа возобновляется.

2. Авария без разбрызгивания ПБА

К ней относится касание петлей с инфицированным материалом края чашки, пробирки, трещина на чашке Петри, пробирке с биоматериалом, падение на стол твердой частицы при обжигании петли после посева, касание поверхности посева на твердой питательной среде и др.

Порядок действий:

1. Наложить тампон с дезсредством на место контаминации ПБА поверхности объекта;
2. Вызвать руководителя подразделения и продолжить дезобработку места;
3. По окончании обработки выйти из помещения, снять и погрузить одежду в дезраствор;
4. Открытые части тела обработать дезраствором или кожным антисептиком;

3. Авария, связанная нарушением целостности кожных покровов;

Порядок действий:

1. Прекратить работу, руки обработать дезраствором, снять перчатки, выдавить из ранки кровь в дезраствор;

2. На место ранения поставить на 4-5 мин компресс из дезраствора или кожного антисептика;

3. При работе с вирусами кровь выдавить в сухую стерильную салфетку и обработать ранку 5% настойкой йода, не применяя дезраствор;

Была ознакомлена с правилами работы в бактериологической лаборатории. Вся работа в бактериологической лаборатории проводится согласно СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность", СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами".

2 день.

Ознакомилась с дезинфекцией и стерилизацией в Бактериологической лаборатории.

В целях профилактики внутрибольничных инфекций осуществляются дезинфекционные и стерилизационные мероприятия, которые включают в себя работы по профилактической и очаговой дезинфекции, обеззараживанию, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

Для проведения дезинфекционных и стерилизационных мероприятий ООМД (организация, осуществляющая медицинскую деятельность) должны регулярно обеспечиваться моющими и дезинфицирующими средствами различного назначения, кожными антисептиками, средствами для стерилизации изделий медицинского назначения, а также стерилизационными упаковочными материалами и средствами контроля (в том числе химическими индикаторами).

Дезинфекция – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение определенного вида патогенного или условно-патогенного микроорганизма в объектах внешней среды с помощью химических антисептиков, физических, биологических воздействий.

В микробиологической лаборатории используют два метода дезинфекции:

1. Химический: основан на применении разнообразных химических веществ, вызывающих гибель микроорганизмов. Его используют с целью обеззараживания различных объектов внешней среды, воздуха, биологических субстратов. При работе в микробиологической лаборатории допускаются дез. растворы, разрешенные к применению на территории РФ.

2. Физический метод: обеспечивает удаление микроорганизмов с объектов путем воздействия физических факторов: высокой температуры горячего воздуха, пара под давлением, ультрафиолетовых лучей.

Контроль работы стерилизатора:

Для проверки стерильности материала и работы автоклава используют химические индикаторы. При объеме автоклава до 100 литров используют 5 индикаторов, если объем автоклава больше 100 литров используют 11 индикаторов. Закладки производятся при каждом цикле. Термический контроль: проводят раз в полгода. Для контроля используют поверенный максимальный термометр с ценой деления не более 1 °С и диапазоном измерений, превышающим контролируемую температуру. Термометр размещают в пяти точках совместно с химическими индикаторами. После окончания цикла стерилизации и остывания термометра до комнатной температуры, снимают показания.

Для определения истинного значения максимальной температуры цикла стерилизации к снятому с термометра показанию прибавляют соответствующую поправку, указанную в паспорте на данный термометр. Биологический контроль проводят 2 раза в год. Для этого используют биотесты, предназначенные для конкретного вида паровой или суховоздушной стерилизации. Пронумерованные пакеты с биотестами (содержат споры микроорганизмов) размещают в контрольных точках стерилизатора.

После проведенной стерилизации в пробирки с биотестами вносят 0,5 мл цветной питательной среды, начиная со стерильной пробирки для контроля питательной среды и заканчивая контрольным тестом, не подвергавшимся стерилизации (контроль культур). Далее пробирки инкубируют. После чего проводят учет изменения цвета питательной среды. В контроле (стерильная проба) цвет среды не изменяется. В пробирке с контролем культуры цвет среды должен измениться на цвет, указанный в

паспорте, что свидетельствует о наличии жизнеспособных спор. Работа считается удовлетворительной, если цвет питательной среды во всех биотестах не изменился (роста нет!). Результаты заносят в журнал и регистрируют. Лабораторную посуду стерилизуют:

1. Сухим жаром при температуре 180°С 60 минут, паром под давлением 134°С 5 минут.

2. В автоклаве при давлении 1,6 атм. в течение 60 минут (126° С), для уничтожения споровой микрофлоры – 90 минут при 2 атм. (132°С). В форвакуумном автоклаве при 134°С 5 минут.

Обеззараживание патогенных культур микробов.

Пробирки и чашки, содержащие культуры микробов, не нужные для дальнейшей работы, складывают в контейнер с крышкой и сдают на обеззараживание. Культуры патогенных микробов убивают в автоклаве при давлении 1,6 атм. в течение 60 минут (126°С), для уничтожения споровой микрофлоры – 90 минут при 2 атм. (132°С). В форвакуумном автоклаве при 134°С 5 минут.

Подготовка к стерилизации и стерилизация бумаги, марли и ваты.

Вату, марлю, фильтровальную бумагу стерилизуют в сухожаровой печи при температуре 160°С в течение часа от момента показания термометром данной температуры или в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 30 минут. Перед стерилизацией бумагу и марлю нарезают кусочками, а вату сворачивают в виде шариков или тампонов нужной величины. После этого каждый вид материала в отдельности по одной или несколько штук заворачивают в плотную бумагу. При разрыве пакета стерилизованный материал следует стерилизовать повторно, так как стерильность его нарушается. Пробка ватномарлевая для пробирок – нестерильный расходный материал, предназначенный для закупорки пробирок. Применяется в диагностических, исследовательских, аналитических лабораториях санитарного либо медицинского назначения

при проведении микробиологических исследований и контроля органических сред. За счет фильтрующих свойств пробка ватномарлевая для пробирок обеспечивает в лабораторную емкость доступ воздуха, лишённого посторонней микрофлоры, для возможности поддержания жизнедеятельности микроорганизмов.

Стерилизация бактериальных петель.

Бактериальные петли, сделанные из нихромовой проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ стерилизации получил название прокалывания или фламбирования.

3 день

Осуществляла прием, регистрацию, маркировку биологического материала.

Регистрируют биоматериал в лабораторной информационной системе qMS. qMS обеспечивает полную автоматизацию технологических процессов современной медицинской лаборатории и поддержку всех видов лабораторных исследований, в том числе микробиологических. Система масштабируется и легко адаптируется к медицинским лабораториям различного типа, профиля и организационной структуры.

Регистрация биологического материала производится в рабочие журналы, для каждого исследования свой журнал:

- 1) Рабочий журнал микробиологических исследований смывов на БГКП;
- 2) Рабочий журнал микробиологических исследований смывов на УПФ (БГКП, *Staphylococcus aureus*);
- 3) Рабочий журнал микробиологических исследований материала на стерильность;
- 4) Журнал внутреннего лабораторного контроля.

4 день

Правила обращения с утилизацией, разработаны в соответствии с требованиями санитарных правил и норм на основании: «Санитарноэпидемиологические 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, упаковка и контейнеры из под проб.

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

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.
- Организации обучения персонала правилам эпидемиологической безопасности при обращении с отходами

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 вывозят по мере необходимости транспортом специального учреждения по договору.

Дезинфекция отходов класса Б физическим способом осуществляется водяным насыщенным паром с избыточным давлением с соблюдением режимов обеззараживания, указанным в Федеральных санитарно-эпидемиологических правилах «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности 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.

Персонал, связанный со сбором, временным хранением и транспортированием отходов обеспечивается комплектами специальной одежды и средствами индивидуальной защиты (халаты, колпак или медицинская шапочка, перчатки, маска, фартуки, нарукавники, специальная обувь)

5 день

Транспортировка биоматериалов

Образцы доставляют в лабораторию в сумках - холодильниках, контейнерах без промедления, в течение 1,5 - 2 часов.

В сопроводительном бланке должно быть поставлено время взятия материала. Сопроводительную документацию к направленному материалу прилагают отдельно, в целлофановом пакете.

Прием и разборка доставленного материала проводится лаборантом с соблюдением мер предосторожности.

При сортировке образцов материала особое внимание лаборант уделяет надежности упаковки и целостности посуды в которой она находится.

Обнаружение каких-либо повреждений емкостей с пробами, загрязнение поверхности посуды содержащимся в ней материалом, отсутствие пробок или крышек в сосуде, служат достаточным основанием для отказа в его приеме.

6 День. Методический день.

Работа с дневником.

7 День. Методический день

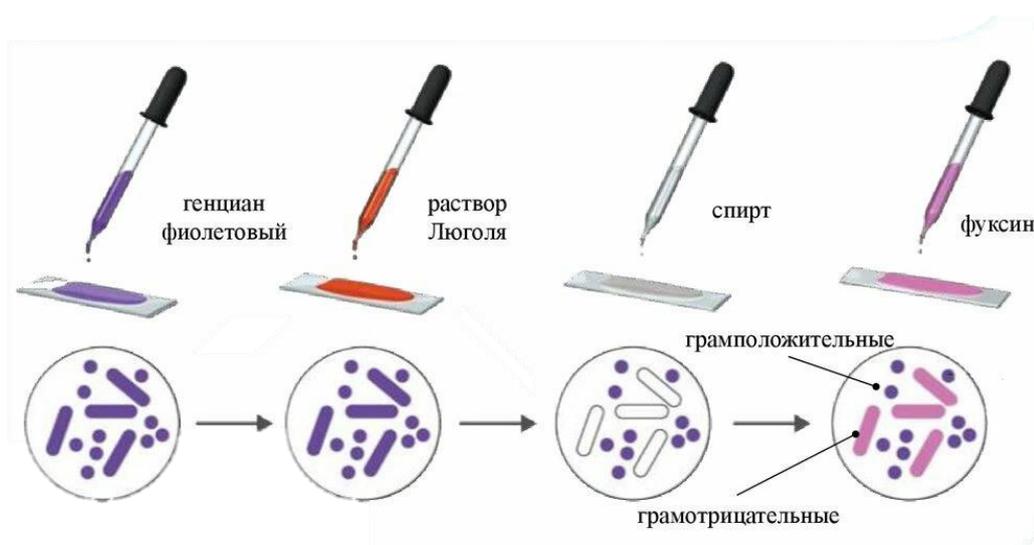
Работа с дневником.

8 день.

Методика окраски по Граму:

1. На фиксированный мазок кладут фильтровальную бумагу.
2. Наносят раствор генцианового фиолетового на 1-2 минуты.
3. Затем снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 минуту.
4. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 95% спирте в течение 30 секунд.
5. Промывают водой.
6. Затем на мазок наносят водный раствор фуксина на 1-2 минуты.
7. Промывают водой и высушивают.

В результате грамположительные бактерии удерживают генциановый фиолетовый в комплексе с йодом и окрашиваются - в фиолетовый цвет, а грамотрицательные бактерии после воздействия спирта утрачивают краситель, обесцвечиваются и при обработке фуксином окрашиваются - в красный цвет.



Отличия Грам+ и Грам- бактерий

Многослойный пептидогликан (40-90% массы клеточной стенки)	Однослойный пептидогликан (5-10% массы клеточной стенки)
Тетрапептиды пептидогликана соединены пентаглициновыми мостиками	Тетрапептиды соединены напрямую
Есть тейхоевые кислоты	Нет тейхоевых кислот
Нет наружной мембраны	Есть наружная мембрана
Нет периплазматического пространства	Есть периплазматическое пространство

9 день.

Посев мочи (на флору).

Перед посевом образец перемешивают, но не центрифугируют.

Нумеруют направление, образец и чашки Петри.

Производится посев на кровяной агар и хромогенную среду «Уроселект». Петлю (10 мкл) обжигают и делают посев на сектор среды «Уроселект» (1 сектор = 1 пациент) и кровяной агар методом рассева.

Для этого необходимо провести вертикальную полосу и распределить материал в разные стороны штрихами.

Посевы ставят в термостат при 37°С на 18-24 часа, после этого проводят учет результатов.

В ряде случаев срок инкубации продляют до 48ч.:

- Образец мочи получен посредством надлобковой пункции;
- После суточной инкубации рост м/о проявляется настолько слабо, что невозможно оценить морфологию культур и выделить их в чистом виде;
- Если необходимо исключить наличие в образце грибов.

10-11 день.

Посев вагинального отделяемого и отделяемое цервикального канала по методу Gould.

Материал для исследования собирают в пробирки с гелем и тампоном.

Нумеруют направление, образец и чашки Петри.

Материал засевают на дифференциально-диагностические среды: кровяной агар, шоколадный, кандида агар, Эндо, ЖСА (желточно-солевой агар) и хромогенная среда для стрептококков.

Бактериологической петлей диаметром 3 мм произвести посев (30-40 штрихов) исследуемого материала на 1-й сектор чашек Петри с питательными средами. После этого петлю прожечь и произвести 4 штриховых посева из 1-го сектора по 2-й, аналогичным образом из 2-го сектора в 3-й, и из 3-го в 4-й, прожигая петлю после пересева с каждого сектора. Расставляем чашки в термостаты.

Инкубация посевов:

Кровяной агар – термостат 37⁰ С

Шоколадный агар – термостат 37⁰ С

Хромогенная среда для стрептококков – термостат 37⁰ С

Агар Эндо – термостат -28⁰ С

ЖСА- термостат -28⁰ С

Кандиселективный агар – термостат 30⁰ С

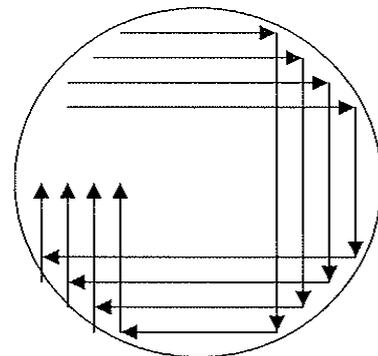
День 12. Методический день.

Работа с дневником.

13 день.

Постановка антибиотикограммы.

Для определения чувствительности используется агар Мюллера - Хинтона. Взвесь изучаемой культуры стандартизируют на спектрофотометре до 0,5 единиц по шкале МАК ФАРЛАНДА, стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объёме 1-2 мл, равномерно распределяют по поверхности чашки покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма при помощи пипетки.



Засеянные чашки подсушивают не более 10-15 минут при комнатной температуре. Затем на поверхность засеянного агара пинцетом или автоматическим диспансером накладывают бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков (диски имеют маркировку).

На одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

После чашки Петри помещают в термостат и инкубируют при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16-24 ч (в зависимости от видатестируемого микроорганизма).

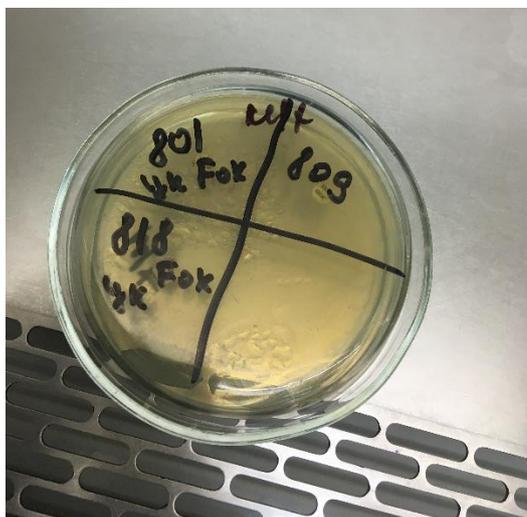
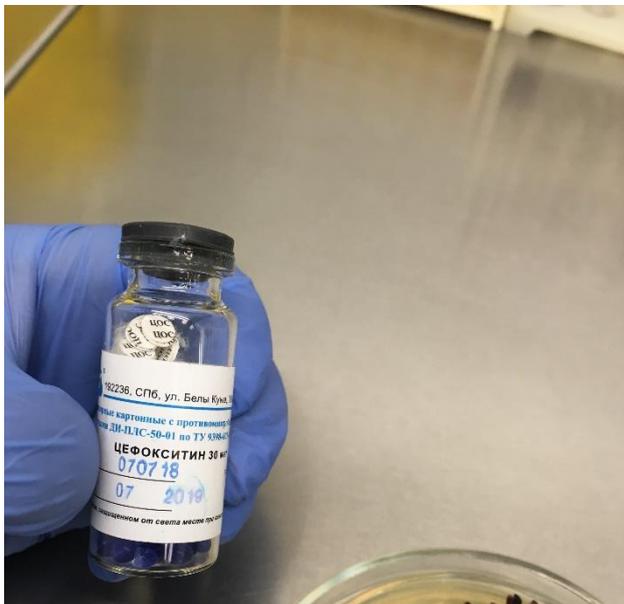
Измерение мутности суспензии

1. Внести в пробирку 1000 мкл SI solution.
2. Приготовить гомогенную суспензию микроорганизма.
3. Включить прибор.
4. Поместить пробирку в гнездо прибора.
5. На дисплее прибора отобразится пунктирная линия, после чего появятся результаты измерения.

6. Полученное значение должно находиться в допустимом диапазоне.

7. Извлекь пробирку из гнезда прибора. Через 1 минуту прибор автоматически выключится.

Таким же способом производила постановку Fox реакций.



14 день.

Посев ректальных мазков на дизентерию и сальмонеллёз

Материал для исследования собирают в пробирки с гелем и тампоном.

Нумеруют направление, образец и чашки Петри.

Материал засевают на дифференциально-диагностические среды: среды Плоскирева и Эндо.

Среда Плоскирева, тормозит рост сапрофитных микробов, поэтому посевного материала на нее наносят в 5-10 раз больше, чем на среду Эндо и др. к тому же она обладает антифаговым действием, что и обеспечивает более высокую высеваемость возбудителей дизентерии.

Однако среда Плоскирева предназначена для выявления шигелл Флекснера и Зонне. Другие виды шигелл на этой среде растут плохо, поэтому желательно сочетать посевы материала одновременно на две разные среды: Плоскирева и Эндо.

Посевы ставят в термостат при 37°С на 24 часа.

После посева на среды Плоскирева и Эндо, тампоны погружают в магниевую среду накопления и ставят в термостат при 37°С на 24 часа.

На вторые сутки с магниевой среды высевают на ВСА (висмут-сульфит агар) и ставят в термостат при 37°С на 24 часа.

15 день.

Посев на среды Гисса

Для определения ферментативной способности микроорганизмов пользуются средами Гисса. В зависимости от наличия в микробной клетке того или иного фермента она способна разлагать какой-либо один из углеводов с образованием определенных продуктов разложения, поэтому в состав среды вводится какой-либо углевод: лактоза, глюкоза, маннит, сахароза и пр. Набор таких сред получил название «пестрого ряда углеводов».

Длинный «пестрый ряд» состоит из: среда Клиглера, среда на подвижность (Пешкова), среда Симонса, ацетатный агар, мочевины, лизин и индольные полоски.

Короткий «пестрый ряд» состоит из: среда Клиглера, среда на подвижность (Пешкова), среда Симонса, ацетатный агар и индольные полоски.

Так же к длинному ряду могут добавляться фенилаланин, сахароза, простой питательный агар.

Чистую культуру исследуемого м/о засевают петлей. Посевы ставят в термостат при 37°C на 24 часа.

В том случае если бактерии ферментируют углевод до образования кислых продуктов наблюдается изменение цвета среды. При разложении углевода до кислоты и газообразования наряду с изменением цвета появляется пузырек газа в поплавке. Если используют среды с полужидким агаром, то образование газа регистрируется по разрыву столбика. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется.

16 -17 день.

Ознакомилась с Иммунодиагностикой: РА, РСК, РП, РИФ, РНГА.

Выявление в биоматериале антигенов бактерий является одним из основных способов диагностики инфекционных болезней, а обнаружение специфических антигенов у микроорганизмов позволяет идентифицировать их на родовом, видовом и серотиповом уровнях. Реакция агглютинации (РА).

Реакция агглютинации – это иммунная реакция взаимодействия антигена с антителами в присутствии электролитов. При данной реакции происходит склеивание антигенов с антителами, образуется хлопьевидный осадок. Самый простой способ постановки РА – РА на стекле: ориентировочная РА, применяемая для определения возбудителя, выделенного от больного. На предметное стекло наносят диагностическую агглютинирующую сыворотку (разведение 1:10 или 1:20), затем вносят культуру от больного. Реакция положительна, если в капле появляется хлопьевидный осадок. Рядом ставят контроль: вместо сыворотки наносят каплю физраствора. При отрицательном результате в капле наблюдается равномерная муть. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА или РПГА) В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроль). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка.

Реакция связывания комплемента (РСК) Антитела, взаимодействуя с соответствующим антигеном, связывают добавленный комплемент (1-я система). Индикатором связывания комплемента служат эритроциты,

сенсibilизированные гемолитической сывороткой, т. е. антителами к эритроцитам (2-я система). Если комплемент не фиксируется в 1 системе, т.е. не происходит реакция антиген-антитело, то сенсibilизированные эритроциты полностью лизируются (отрицательная реакция). При связывании комплемента иммунными комплексами 1-й системы после добавления сенсibilизированных эритроцитов гемолиз отсутствует (положительная реакция). РСК используется для диагностики инфекционных болезней.

Реакция преципитации в агаре. Взаимодействие антигена и антитела происходит в плотной среде. Образующийся преципитат при взаимодействии токсина и антитоксина дает в толще среды мутную полосу (закругленные линии). Отсутствие полосы свидетельствует о несоответствии компонентов реакции. Реакция применяется при изучении токсинообразования у возбудителя дифтерии. В чашки Петри разливают агар Мартена (12-15 мл), сохраняя прозрачность. После застывания агара накладывают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной противодифтерийной анитоксической сывороткой. Испытуемую культуру засевают с помощью петли «бляшками» ($d=0.8-1.0$ см) на расстоянии 0,5-0,7 см от края бумаги. Между двумя бляшками испытуемой культуры засевают бляшки токсигенного штамма. Испытуемую культуру считают токсигенной, если линии преципитации четки и сливаются с линиями преципитации контрольного (токсигенного) штамма. Если линии преципитации перекрещиваются с линиями контрольного штамма или отсутствуют, выделенную культуру считают нетоксигенной.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) (метод Кунса). Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом. Реакция Кунса 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 антимикробной 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 + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

18 день. Методический день.

Работа с дневником.