**Техника безопасности в микробиологической лаборатории**

Работа в микробиологической лаборатории требует постоян­ного и педантичного соблюдения правил безопасности и личной ги­гиены.

Основными правилами работы студента в микробиологической лаборатории являются следующие:

1. Работать в спецодежде: в халате (а в боксе - в сменном халате), в сменной обуви, шапочке или косынке, а при необходимо­сти - в марлевой повязке.

2. В рабочих помещениях лаборатории запрещается курить, принимать пишу, ходить без надобности между столами и открывать форточки, чтобы не допускать циркуляцию микроорганизмов с током воздуха. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи. Портфели и сумки складывают в специально отведенном месте.

3. На рабочем месте размещают только оборудование, необходимое для выполнения конкретной работы. Студенты приступа­ют к работе только с разрешения преподавателя и всю работу проводят в строгом соответствии с изучаемой методикой.

4. При использовании спиртовок необходимо следить за их герметичностью. Не оставлять без надобности горящую спиртовку, пламя гасить только колпачком.

5. Во время работы в лаборатории на руках не должно быть колец, перстней и накладных ногтей. Ногти должны быть коротко острижены.

6. Во избежание инфицирования рук работать только бактериологической петлей и пинцетом. Использованные инструменты и предметы необходимо прожигать над пламенем горелки или помещать в дезинфицирующий раствор.

7. Если в процессе работы инфицированный материал попал на кожу, слизистую оболочку глаз или в рот, необходимо срочно поставить в известность преподавателя и при его непосредственном участии провести необходимые меры по обеззараживанию.

8. При попадании на поверхность стола капель раствора, со­держащих микроорганизмы, необходимо извлечь пинцетом ватный тампон, смочить его в 70% этиловом спирте или в 3% водном растворе хлорамина и обработать инфицированные места.

9. Мазки из исследуемых микроорганизмов необходимо фиксировать над пламенем горелки или в фиксирующем растворе.

10. Отсасывание исследуемого материала необходимо произ­водить с помощью стерильных автоматических или полуавтоматических пипеток.

11. Во время работы нельзя класть на стол инструменты, пипетки, ватные пробки, предметные и покровные стекла. Все должно находиться в штативе, фарфоровых стаканчиках, на столиках для предметных стекол и в других, специально отведенных местах.

12. Все засеянные пробирки и чашки помещаются в термостат.

13. Использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели сразу же погружают на одни сут­ки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят. Отработанные чашки Петри и пробирки с посевами микроорганиз­мов собирают в биксы и передаются преподавателю для автоклавирования. Зараженный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению.

14. Уборку помещений лаборатории проводить влажным способом. Перед работой в боксе и предбокснике необходимо включать бактерицидные лампы. Поверхность стола, где проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать путем протирания 3% раствором хлорамина или 70% этиловым спиртом.

15. Не допускается вынос инфицированного материала за пределы помещений лаборатории.

**День 1**

**Первичный инструктаж по технике безопасности в микробиологической лаборатории**

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. Среды 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.

**День 2**

**Ознакомление со структурой**

**микробиологической лаборатории**

Помещения разделяют на “чистую” и “грязную” зоны.

В "чистой" зоне лабораторий должны располагаться следующие помещения:

• гардероб для верхней одежды;

• помещения для проведения подготовительных работ

• (препараторская, моечная, приготовление и розлив питательных сред и др.);

• помещение для стирилизации питательных сред и лабораторной посуды (стерилизационная);

• помещение с холодной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов;

• помещения для работы с дакументами и литературой;

• помещение отдыха и приема пищи;

• кабинет заведующего;

• помещение для хранения и одевания рабочей одежды;

• подсобные помещения;

• туалет.

В "заразной" зоне должны размещаться:

• помещения для приема и регистрации материала (проб);

• боксированные помещения с предбоксами или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности;

• помещения для люминесцентной микроскопии;

• помещения для гельминтологических исследований;

• помещения для ПЦР-диагностики;

• термостатная комната;

• помещения для обеззараживания (автоклавная)

**День 3-4**

**Прием биоматериала**

Участвовала в приеме и разборе биологического материала. Все направления вбивала в базу QMS.

**Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков , возбудителей кишечных инфекций, ВКИ.**

**Этапы приготовление питательных сред**

1. Подготовка и стерилизация посуды и пробок для питательных сред.

Стеклянную посуду (колбы, флаконы, пробирки), используемую дляприготовления питательных сред, необходимо стерилизовать в сухожаровом шкафу или автоклавировать.

Пробирки, колбы, флаконы, бутыли закрывают ватными стерилизуемыми пробками, которые готовят следующим образом: кладут на стол продолговатую четырехугольную пластинку ваты соответствующей величины, загибают внутрь все четыре края так, чтобы получилась ленточка, по ширине равная длине пробки, и скатывают валик по диаметру пробирки или колбы. Ватную пробку обертывают кусочком марли в один-два слоя. Концы марли снаружи над пробкой крепко связывают ниткой. Можно использовать специальные автоматизированные устройства для изготовления ватных пробок нужного размера, а также коммерческие целлюлозные и автоклавируемые пластиковые пробки.

Перед приготовлением питательных сред ватные пробки предварительно стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 40 мин и затем тщательно высушивают в сушильном шкафу.

При использовании стеклянных чашек Петри, их необходимо предварительно простерилизовать в автоклаве 1 час при 1 атм. (или в сухожарочном шкафу 1 час при 180 °С).

Стерилизацию проводят либо в специальных биксах, либо стопки чашек заворачивают в плотную бумагу крафт.

2. Отвешивание: отбирают навеску указанную на упаковке с коммерческой средой на весах.

Сухие питательные среды в целом не являются безопасными. Они содержат такие вредные/токсичные вещества, как соли желчных кислот, азид, селенит, красители и т.д., а также порошок. Рекомендуется принять меры предосторожности во избежание воздействия порошковых сухих питательных сред. Вдыхание пыли от порошка, возникающей при взвешивании, может быть опасным и его следует не допускать. Применение лицевой маски дает некоторую защиту от пыли в воздухе. Рекомендуется использовать при взвешивании сред вытяжной шкаф. Он дает хорошую защиту от пыли в воздухе. Перед отвешиванием проверьте содержимое контейнера, дату первого открывания на этикетке, срок годности, название среды. Точно следуйте инструкциям производителя по приготовлению, указанным на этикетке. Рекомендуется не отвешивать большее количество, чем требуется для приготовления максимум 1 литра среды. Сухую питательную среду следует взвешивать в лодочке для взвешивания или в чистой мензурке. Необходимо использовать лабораторные весы с точностью ±0,1 г. При отвешивании

отдельных компонентов, красителей и т.д. надо применять аналитические весы с точностью ±0,001 г. Все весы ежегодно поверяются и калибруются , результаты поверки записываются в книгу обоудования отдела контроля/обеспечения качества. Весы должны устанавливаться на прочную ровную поверхность. Проводите уборку после взвешивания. Остающийся на весах порошок может загрязнить их внутренние детали, что приведет к ухудшению точности весов. Для чистки следует использовать воду или дезинфицирующее средство для поверхностей, например 70% этанол.

3. Растворение: навеску питательной среды растворяют в предварительно нагретой до 70 °С дистиллированной воде в колбе/кастрюле. Вода,   
  
используемая при приготовлении сухих питательных сред, должна быть очищена и деионизирована и не содержать никаких питательных и/или токсичных (ингибирующих) веществ. Водопроводную воду использовать нельзя!!!.

4. Кипячение: растворы питательных сред кипятят на электро-плите в течении 2 мин.

5. Установление pH: Значение pH во многом зависит от состава питательной среды, температуры замера pH (обычно, 25°C) и процессов, которым среда подвергалась при восстановлении (растворении) и стерилизации.

В целом, нет необходимости регулировать pH коммерчески выпускаемой питательной среды. Сухие питательные среды имеют типичный состав, и pH могло быть отрегулировано до требуемых значений. Однако, для питательных сред, приготовленных из отдельных компонентов, может потребоваться регулирование pH. pH должно регулироваться так, чтобы после стерилизации и охлаждения до 25°C у среды было требуемое pH ±0,2 единиц pH, если только в инструкции производителя не предусмотрено иное.

Проверка pH проверяется специальными индикаторными тестовыми полосоками. При необходимости, pH должно быть отрегулировано до заданного значения. pH следует корректировать добавлением 1 молярной доли или 1/10 молярной доли соляной кислоты (1 молярная доля или 1 моль – 36,5 г HCl в 1 литре воды) или 1 молярной доли или 1 моли раствора едкого натра (40 г в 1 литре воды) к образцу известного объема, взятому из восстановленной питательной среды (например, 50 мл). По объему добавленной кислоты или щелочи можно рассчитать количество, необходимое для регулирования pH приготовленной питательной среды   
  
  
(раствор кислоты или щелочи должен стерилизоваться при добавлении к уже стерилизованной среде). Поэтому среда должна быть в жидком состоянии при замере pH образца.

6. Фильтрация жидких и расплавленных плотных сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена – они быстро застывают, их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

7. Розлив сред для стерилизации: питательные среды разливают не более чем

на 3/4 флакона (так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность) , и по пробиркам в зависимости от нужной высоты столбика.

8. Стерилизация: это процедура, применяемая в целях полной ликвидации жизнеспособных микроорганизмов в материале или среде.

Для стерилизации питательный сред используют термический способ: стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование).

Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в инструкции на упаковке.

Питательные среды чувствительны к температуре, и чрезмерная стерилизация, длительное нагревание и охлаждение, неправильная загрузка в автоклав могут изменить состав среды. Перегрев может вызвать ряд недостатков в среде, например, неверное значение pH, карамелизацию, ненормальную окраску, невозможность затвердевания и т.д. Поэтому важно контролировать общее проникновение теплоты в среду. Расстояние между флаконами определяет поток пара и, соответственно, удаление воздуха и проникновение теплоты. Следовательно, автоклавы не должны перегружаться. Флакон должен размещаться так, чтобы обеспечить   
  
  
свободное прохождение пара. Пробирки и флаконы закупориваются не поглощающей влагу ватой или неплотно закрываются колпачками. Пробирки следует размещать в держателях или неплотно – в корзинках. Флаконы не должны наполняться более, чем на две трети. При автоклавировании 3–5 % жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в   
  
приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5 % дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда будет иметь требуемую концентрацию.

9. Добавление компонентов (стерильных добавок) после стерилизации.

После автоклавирования стерильную среду остужают до температуры 40-45 С при комнатной температуре, либо в водяной бане.

Чувствительные к температуре стерильные добавки, например, кровь или яично-желтковая эмульсия, стерилизованные фильтрованием растворы антибиотиков или добавки с антибиотиками, вносятся в среды после стерилизации. Перед добавлением растворов их нужно проверить на полноту растворения и, в случае крови и яично- желтковой эмульсии, визуально на отсутствие микроорганизмов. Добавки следует вносить в среды при температуре не выше 44 - 47°C. Добавляемые растворы должны адаптироваться к комнатной температуре (25°C). Холодный раствор прямо из холодильника может вызвать образование хлопьев в агаровой среде или загустевание. Это помешает должному смешиванию.

10. Заливка агаровых чашек.

Перед заливкой агаровых чашек среда должна быть охлаждена до 44 - 47°C. Заливка при более высокой температуре приводит к появлению излишнего конденсата воды на крышках чашек Петри. Среду перед заливкой следует взболтать для обеспечения ее гомогенности. В чашки Петри заливают по 15 – 18 мл жидкой агаровой среды так, чтобы получить слой   
  
  
агара толщиной не менее 2 - 3 мм, с соблюдением стерильных условий. Дайте агару остыть и затвердеть. Переверните чашки и пометьте на их дне дату приготовления и вид среды. Готовые среды разносят в холодильник по отделам лаборатории,1% сред отдают на контроль.

11. Пробирки после стерилизации.

Пробирки после автоклавирования, вынимают из автоклава, дожимают до упора колпачки и раскладывают горячими на бортик подноса для   
  
получения скоса среды примерно на 45° до застывания агара. Пробирки с полужидкими и жидкими средами, оставляют при комнатной температуре до полного остывания. Застывшие и остывшие пробирки маркируют, (дата приготовления и наименование) и хранят в холодильнике. 1% от партии идет на контроль.

12. Повторное расплавление приготовленной агаровой среды во флаконах.

Расплавьте агаровую среду, поместив сосуд или пробирку с неплотно закрытым колпачком в кипящую воду (водяную баню), или в автоклаве при 0,5 атм 10 мин. Следует избегать перегрева. Среда полностью расплавлена, когда при взбалтывании пузырьки воздуха проходят через центр. Расплавленная среда должна использоваться как можно быстрее. Не расплавляйте среду дважды!

13. Контроль: для контроля стерильности среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают. · химический контроль окончательно устанавливает pH, для биологического контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах

**День 5-6   
   
 Микробиологическая диагностика возбудителей**

**инфекционных заболеваний Staphylococcus aureus**

Исследуемыйматериал засевают на чашки с желточно-солевым (ЖСА) и кровяным МПА, инкубируют при 370С сутки.На 2 день учитывают характер

роста колоний на обеих средах. На желточно-солевом агаре колонии стафило­кокка имеют ровные края, гладкую поверхность, вокруг колонии образуется радужный венчик в результате расщепления лецитина яичного желтка ферментом лецитовителлазой; цвет пигмента колоний варьирует от золотистого до белого. На кровяном МПА вокруг колоний образуются зоны

гемолиза. Из типичных для стафилококка колоний делают мазок, окрашивают его по Граму, микроскопируют. Оставшуюся часть колонии пересевают на скошенный МПА для получения чистой культуры. На 3 день проводят идентификацию выделенной культуры стафилококка с дифференциацией основных видов, определяют чувствительность к антибиотикам методом бумажных дисков и фаговар (набор для фаготипирования состоит из фагов 21 типа, разделенных на 4 группы; при внутрибольничных инфекциях наиболее часто встречаются фаговары 77 и 80).

**День 7**

**Иммунодиагностика**

1. Реакция связывания комплемента (РСК).

Сущность метода заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), те происходит связывание комплемента комплексом антиген - антитело. Если же комплекс антиген - антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

PCK 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 сенсибилизированных 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).

2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - современный точный метод диагностики инфекционных заболеваний, опухолей, генетических аномалий.

Сущность метода заключается в том, чтобы с помощью специального фермента ДНК-полимеразы в искусственных условиях увеличить в объеме определенную микробную среду. Для этого многократно преумножают имеющийся ДНК-материал. Таким образом, при наличии патогенного микроорганизма в образце его количество будет увеличено за счет биохимических лабораторных манипуляций, и бактерию не составит труда обнаружить в микроскоп.

**День 8**

**Микробиологическая диагностика Streptococcus pyogenes**Исследуемый материал (гной) за­севают на кровяной агар в чашку Петри. После инкубации при 37 °С в течение 24 ч отмечают характер колоний и наличие вокруг них зон гемолиза. Из части материала, взятого из коло­ний, готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для получения чистой культуры 1—3 подозрительные колонии пересевают в пробирки со скошенным кровяным агаром и сахарным бульоном. На кровяном агаре Streptococcus pyogenes образует мелкие мутноватые круглые колонии. По характеру гемолиза на кровяном агаре стрептококки делятся на три группы: 1) негемолитические; 2) а-гемолитиче-ские 3) β-гемолитические, образующие вокруг колонии пол­ностью прозрачную зону гемолиза. Заключительным этапом бактериологического исследования является идентификация выделенной культуры по антигенным свойствам. По данному признаку все стрептококки делят на серологические группы (А, В, С, D и т. д.). Серогруппу определяют в реакции преципитации с полисахаридным преципитиногеном С. Серовар определяют в реакции агглютинации.

**День 9-10**

**Микробиологическая диагностика**

**Pseudomonas aeruginosa**

Материал для исследования: кровь, гной и раневое отделяемое, моча, мокрота. Бактериоскопия – нет, от­сутствие морф. и тинктор. особенностей. Основной метод диагностики - бактериологи­ческое исследование клинического материала, позволяет не только идентифицировать возбудитель, но и определить чувствительность бактерий к антимикробным препаратам. При идентификации учитывают рост на агаре, поло­жительный цитохромоксидазный тест, выявление термофильности. Для внутривидовой идентификации бактерий приме­няют серотипирование. Серологический метод исследования на­правлен на обнаружение специфических антител к антигенам палочки с помощью РСК, РНГА.****

**Микробиологическая диагностика**

**возбудителей инфекционных заболеваний**

**Salmonella enteritidis**

Исследуемый материал (испражнения) засевают на чашки с висмут-сульфитным агаром и в среды накопления (маг­ниевую, селенитовую), из которых через 6— 10 ч делают пересев на висмут-сульфит агар. Посевы выращивают при температуре 370 С, на второй день отбирают колонии черного цвета и пере­севают на среду Олькеницкого (или Ресселя) для накопления чистой культуры*.*На 3-й день исследования выделенные чистые культуры пересевают в сре­ды «пестрого» ряда и ставят РА с поливалентными и групповыми (А, В, С, Д, Е) адсорбированными сальмонеллезными сыворотками*.*Если получен положительный результат с одной из групп сывороток, проводят РА с адсорбированными О-сыворотками, характерными для данной группы, а затем с монорецепторными Н-сыворотками (неспецифической и специфической фазами) для определения серогруппы и серовара сальмонеллы в соответствии со схемой Ка­уфмана-Уайта.

На 4-й день исследования учитывают изменения сред «пестро­го» ряда (. Возбудители сальмонеллезне ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кисло­ты и газа, не образуют индола и (за небольшим исключением) выделяют сероводород.

**День 11-12**

**Микробиологическая диагностика**

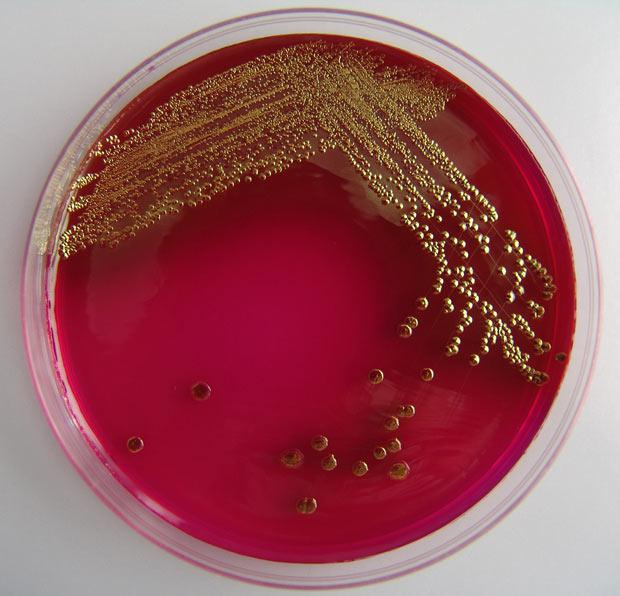
**Proteus mirabilis**

Биоматериал (мокрота) от больного засевают на жидкие и твердые питательные среды. Первичный посев осуществляют на простые среды — Эндо, Плоскирева, висмут-сульфитный агар. Для выделения и накопления чистой культуры подозрительные колонии пересевают на трехсахарную среду Олькеницкого. Протей ферментирует глюкозу до кислоты и газа, не расщепляет лактозу и продуцирует сероводород. Биохимические свойства определяют на средах Гисса. Первичную дифференциацию культур протея обосновывают ползучим ростом на скошенном агаре. В конденсат скошенного МПА засевают культуру. Протей, размножаясь, распространяется из конденсационной воды вверх по агару – «вползает» на его поверхность. Патогномоничным диагностическим признаком протея является его способность дезаминировать фенилаланин. После выделения возбудителя из биоматериала определяют его чувствительность к различным антибактериальным препаратам.

**Микробиологическое исследование**

**Escherichia coli**

Материалы (исключая кровь) высевают на среду Эндо и помещают в термостат при температуре 37°С. Через 18–24 ч инкубации в термостате с этой среды отбирают красные лактозоположительные колонии эшерихий и агглютинируют их на стекле в поливалентной ОК–сыворотке, содержащей антитела к 22 сероварам энтеропатогенных кишечных палочек (ЭПКП). При положительной реакции агглютинации колонии пересевают на скошенный агар и на следующие сутки выделенную культуру агглютинируют в поливалентных сыворотках с меньшим набором антител, а затем в каждой из тех, которые входили в смесь, вызвавшую агглютинацию выделенных эшерихий. На заключительном этапе серологической идентификации ЭПКП ставят развернутую реакцию агглютинации в специфической сыворотке. Для этого диагностическую сыворотку разводят в двух рядах пробирок до титра, который указан на этикетке ампулы. В один из них добавляют смытую со скошенного агара гретую культуру, в другой – ее прокипяченную взвесь. Пробирки помещают на сутки в термостат при температуре 37°С. Гомологичные сыворотке штаммы ЭПКП должны агглютинироваться в ней хотя бы до половины титра.

Давшая положительную развернутую реакцию агглютинации культура засевается в среды ряда Гисса для изучения ее сахаролитических и протеолитических свойств. Escherichia coli расщепляет лактозу, глюкозу, сахарозу, маннит, мальтозу до образования кг, образует индол 

**День 13-14**

**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.

**Микробиологическая диагностика кишечного дисбактериоза**

Посевы изучают на наличие патогенных микроорганизмов и на нарушение соотношений микрофлоры. Для обогащения в качестве обязательных рекомендуют использовать среды *Мюл­лера-Хитона,* селенитовый бульон, магниевую среду; для культивирования – среды Плоскирева, Эндо и Левина (одна из них градиентная), КА, среду Цёйсслера, среду Сабуро, среду Блаурткаили тиогликолевый бульон и др. Патогенные бактерии определяют на средах с анти­биотиками; исследования на дисбактериоз проводят для получения основных критериев и пока­зателей. Результаты исследования следует считать объективными при анализе роста изолиро­ванных колоний, у которых можно изучить морфологию и подсчитать их общее количество на чашку Петри. При сплошном росте анализ следует повторить, производя высев из больших разведении. Факультативные бактерии культивируют 24-48 ч при 37 "С, бифидобактерии – 48 ч, анаэробы и бактероиды – 4-5 сут в анаэростате, посевы на среде *Сабуро*– 96 ч при 28-30 "С. После идентификации производят пересчёт содержания микроорганизмов каждой таксономической группы на 1 г исследуемого материала. *К оценке* результатов следует подходить осторожно,т.к. состав кишечной микрофлоры подвержен различным колебаниям и необходимо отличать истинный дисбактериоз от дисбактериальных реакций (сдвиги в составе микрофлоры незначительны либо кратковременны и не требуют специфической коррекции). При истинном дисбактериозе нарушения микробного ценоза обычно коррелируют с клиническими проявлениями, и их нормализация достаточно длительна (20-30 сут). При выдаче результатов следует указать на наличие или отсутствие патогенной микрофлоры и дать состав присутствующих микроорганизмов. При наличии дисбактериоза необходимо указать следующие параметры:

Содержание общего количества *Escherichia coli,* полноценных в ферментативном отношении.

Наличие гемолитических *Escherichia coli*(в %).

Наличие прочих условно-патогенных бактерий (в %).

Наличие ассоциаций грамотрицательных бактерий, плазма-коагулирующего стафилококка и других ассоциаций.

Наличие бактерий рода *Proteus.*

Наличие грибов рода *Candida.*

Наличие или отсутствие бифидобактерии, лактобактерий, бактероидов и прочих в минималь­ных разведениях фекалий.

Наличие ассоциаций аэробных и анаэробных бактерий.

Повторные исследования. Следует отразить имеющиеся позитивные или негативные сдвиги; при обнаружении патогенной микрофлоры необходимо изучить её чувствительность к антибактериальным препаратам или бактериофагам. При определении чувствительности следует отдать предпочтение антибиотикам узкого спектра действия для возможно более селективного подавления патогенов. Содержание различных бактерий в фекалиях здоровых взрослых лиц и детей первого года жизни(сначала цифры для взрослых, после запятой- для детей) Количество бактерий в 1 г испражнениий (указывается только степень, цифру 10 не пишу, например вместо 108-109пишу 8-9):

Бифидобактерии (8-9, 9-10), лактозодефектные (5-7, 6-7)

Бактероиды (9-10, 8), протеус( 4,3)

Лактбациллы(6-7, 6-8)

Молочнокислый стрептококк (6-8, 7-8)

**День 15**

**Санитарно-бактериологическое исследование воздуха**

**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**

Бактериоуловитель Речменского. Перед работой прибор заполняют стерильной содой. Действие прибора основано на протягивании через него воздуха с помощью аспиратора. При этом происходит распыление находящейся в приборе жидкости. После окончания просасывания жидкость, через которую был пропущен воздух, засевают по 0,1-0,2 мл на МПА в чашках Петри. При необходимости использовать элективные среды посевную дозу увеличивают (0,3-0,5 мл). Полученная в приемнике жидкость может быть использована для заражения животных (например, при исследованиях, проводимых для выявления вирусов, риккетсий и т. д.).

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.

**Первый день исследования**:

Отобранные пробы помещают в термостат при 37° С на 18-24 ч.

**Второй день исследования:**

Чашку вынимают из термостата и производят подсчет колоний. Бактериальное загрязнение воздуха выражается общим числом микробов в 1 м3 его.

Расчет. Например, за 10 мин пропущено 125 л воздуха, на поверхности выросло 100 колоний.

Число микробов в 1 м воздуха = 100\*1000/125 = 800

Для определения золотистого стафилококка забор производят на желточно-солевой агар. Чашки с посевами инкубируют в термостате при 37° С в течение 24 ч и 24 ч выдерживают при комнатной температуре для выявления пигмента. Колонии, подозрительные на S. aureus, подлежат дальнейшей идентификации (см. главу 14).

В детских учреждениях воздух проверяют на наличие сальмонелл. Для этого воздух засевают в чашку со средой висмут-сульфитный агар.

Выявление патогенных бактерий и вирусов в воздухе закрытых помещений проводят по эпидемиологическим показаниям. Для выявления возбудителей туберкулеза пользуются прибором ПОВ, в качестве улавливающей используется среда Школьниковой.

**Исследование смывов с рук и объектов**

**окружающей среды**

Брала смывы с рук на стерильность у анестезиологов, медицинских сестер, хирургов перед операцией, а также смывы с операционного поля.

Взятие смывов производится с помощью стерильных ув­лажненных ватных тампонов. Стерильные ватные тампоны на стеклянных, металлических или деревянных палочках, вмонтированных в пробирки с ватными пробками, заготав­ливают заранее в лаборатории. В день взятия смывов в каж­дую пробирку с тампоном наливают (в условиях бокса над горелкой) по 5 мл стерильного 0,1% водного раствора пептона таким образом, чтобы ватный тампон не касался жид­кости. Смывы с крупного оборудования и инвентаря берут с по­верхности 100 см2, для ограничения поверхностей использу­ют шаблон (трафарет), сделанный из проволоки. Трафарет имеет площадь 25 см2, чтобы взять смывы с площади в 100 см2 его накладывают 4 раза в разных местах поверхнос­ти контролируемого объекта.

При взятии смывов с мелких инструментов обтирается вся поверхность предмета, при заборе смывов с тарелок про­тирают всю внутреннюю поверхность. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирают три одноимен­ных объекта — три тарелки, три ложки и т. п. У столовых приборов протирают их рабочую часть.

При исследовании стаканов протирают внутреннюю по­верхность и верхний наружный край стакана на 2 см вниз.

При взятии смывов с рук протирают тампоном ладон­ные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каж­дой ладони и пальцам, затем протирают межпальцевые про­странства.

При взятии смывов с санитарной одежды протирают 4 площадки по 25 см2 — нижнюю часть каждого рукава и 2 площадки с верхней и средней частей передних пол спе­цовки. С различных мест полотенца берут 4 площадки по 25см2.

**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, нагревающийся с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 1600С в течение 120 мин. Стерилизуют сухим жаром лабораторную посуду и другие изделия из стекла, инструменты, силиконовую резину. Обработку паром под давлением в паровых стерилизаторах (автоклав) является наиболее универсальным методом стерилизации. Поскольку кроме высокой температуры на микробы оказывает воздействие и пар, споры погибают уже при 1200С. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2атм – 1210С – 15-20 мин. Стерилизуют в автоклаве большую часть предметов: перевязочный материал, белье, питательные среды, растворы, инфекционный материал. В настоящее время применяют еще один метод тепловой стерилизации, предназначенный специально для молока – ультравысокотемпературный (молоко обрабатывают в течение нескольких секунд при 130-1500С.

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

Если отсутствует возможность подвергнуть предмет стерилизации, проводится дезинфекция. Например, нельзя простерилизовать бокс, в котором ведутся работы с заразным материалом, операционный стол, руки хирурга или оптиковолоконные микроскопы. После дезинфекции нет необходимости защищать продезинфицированный материал от попадания микробов извне. Различают 3 основных метода дезинфекции: тепловой, химический, УФ-облучение.

Утилизация – это комплекс мер, направленных на переработку отходов. Изначально этот процесс нацелен на то, чтобы отделить сырье, пригодное для повторного использования, от ненужного мусора. Дальше отходы сжигают или отправляют на полигоны для захоронения.

Классификация медицинских отходов:

Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам.

Класс Б – эпидемиологически опасные отходы.

Класс В – чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы.

Класс Г – токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности.

Класс Д – радиоактивные отходы.

Химическая дезинфекция – это обработка оборудования, комплектующих, а также прочих элементов с помощью хлора или других подобных веществ. Этот метод утилизации сочетается механическим измельчением, чаще всего с целью достичь растворения «мусора».

Инсинерация – это сжигание мусора, можно без специальной сортировки. Процесс полностью контролируется оператором. Однако требуется работа очистных сооружений на предмет улавливания вредных газов.