**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 (02.03.19)**

**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 2 (04.02.19)**

**Ознакомление с нормативными документами микробиологической лаборатории**

1. СанПиН от 18 мая 2010 г. N58.2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям осуществляющим медицинскую деятельность».
2. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителям паразитарных болезней» от 28 января 2008.
3. СанПиН 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов ЛПУ».

**Документы бактериологической лаборатории**

1. Инвентарная книга музейных штаммов культур.
2. Журнал учета движения материала в лаборатории.
3. Журнал учета стерилизации и уничтожения инфицированного материала.
4. Журналы исследований (экспертиз).

**Дезинфекция и стерилизация .**

Дезинфекция – это комплекс мер, используемый для уничтожения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Для проведения дезинфекции обычно используются химические дезинфицирующие средства. Основные виды дезинфекции : профилактическая , текущая и заключительная дезинфекция .

1. Профилактическая - проводится постоянно, независимо от эпидемической обстановки: мытьё рук, окружающих предметов с использованием моющих и чистящих средств, содержащих бактерицидные добавки.
2. Текущая - проводится у постели больного, в изоляторах медицинских пунктов, лечебных учреждениях с целью предупреждения распространения инфекционных заболеваний за пределы очага.
3. Заключительная - проводится после изоляции, госпитализации, выздоровления или смерти больного с целью освобождения эпидемического очага от возбудителей, рассеянных больным.

**Методы дезинфекции :**

1. Механические - предусматривает удаление заражённого слоя грунта или устройство настилов (влажная уборка помещений, покраска стен).
2. Физический - солнечный свет , ультрафиолетовое облучение , или источниками гамма-излучения.Ультрафиолетовое облучение используется для обеззараживания воздуха помещений в лечебных и других учреждениях.
3. Химический метод дезинфекции состоит в применении различных химических веществ, вызывающих гибель микроорганизмов на поверхности и внутри объектов и предметов окружающей среды, а также в воздухе и различных субстратах .

Стерилизация — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение вегетативных и споровых форм патогенных и непатогенных микроорганизмов .

Осуществляется:

1. Воздушным методом (воздушный стерилизатор) Стерилизация происходит горячим воздухом. Режимы стерилизации: 1. Режим -основной(180℃- 60 минут - предназначен для стерилизации изделий из метала ) 2. Режим -щадящий(160℃-150минут - предназначен для стерилизации изделий из силиконовой резины)
2. Паровым методом (автоклавирование) В автоклаве питательные среды дезинфицируются : при 120℃- 15 минут, при 110℃- 20-30 минут. Посуда стерилизуется при 120℃ 30 минут
3. Прокаливанием . Является одним из наиболее надежных видов стерилизации. Осуществляется в тигельных печах нагреванием объекта до 500—800° или же его прокаливанием на голом огне. Применяется для стерилизации пинцетов, петель.
4. Кипячением (питательные среды)

**День 3 (05.03.19)**

**Прием биоматериала**

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

**Приготовление питательных сред**

**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 илиавтоклавировать.

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. Фильтрацияагаровых 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 среды.

**День 4 (06.03.19)**

**Прием биоматериала**

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

**Приготовление питательных сред**

Требования, предъявляемые к средам:

1. Должны быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей
2. Быть стерильными
3. Быть прозрачными
4. Быть изотоничными для микробной клетки

Классификация питательных сред:

1. По исходным компонентам
* Натуральные(готовят из продуктов животного и растительного происхождения)
* Синтетические(готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде)
1. По консистенции
* Плотные(применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем)
* Полужидкие(готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин)
* Жидкие
1. По составу:
* Простые(относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду)
* Сложные(готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма)
1. По назначению
* основные (общеупотребительные) среды- служат для культивирования большинства патогенных микробов. Это вышеупомянутые МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода;
* специальные среды- служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.
* элективные (избирательные) среды - служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среды становятся элективными при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН.
* дифференциально-диагностические среды - позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности. При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды;
* консервирующие среды- предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов. Пример такой среды - глицериновая смесь, используемая для сбора испражнений при исследованиях, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.

Готовила общеупотребительные (МПА,МПБ,МПЖ), элективные (Эндо,), среды для выделения возбудителей гнойно-воспалительных и кишечных инфекций.

**День 5 (07.03.19)**

**Прием биоматериала**

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

**Изучение культуральных, морфологических свойств**

Морфологические свойства

Определяла путем бактериоскопии окрашенных мазков и изучения микробов в живом виде (висячая капля). При микроскопировании обращают внимание на форму микроба, его расположение, величину, наличие спор, капсул, отношение к методам окраски.

Размеры микроорганизмов колеблются от 0,4 до 10 мкм.

Различают 3 формы микроорганизмов:

1. Шаровидные – кокки:
* микрококки – деление и расположение беспорядочно;
* диплококки – деление в одной плоскости, расположение по 2;
* стрептококки – деление в одной плоскости, расположение цепочкой;
* тетракокки – деление в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, расположение по 4;
1. Цилиндрическая или палочковидная форма:
* диплобактерии и диплобациллы – делятся в одной плоскости и располагаются по 2;
* стрептобактерии и стрептобациллы – делятся в одной плоскости и располагаются цепочкой;
* большинство палочковидных форм делятся хаотично и располагается по одному.
1. Извитые:
* вибрионы – напоминают запятую или полумесяц
* спириллы и спирохеты – имеют винтообразное строение.

Различают Грам «+», они окрашиваются в синий цвет и Грам «-» микроорганизмы, они окрашиваются в красный цвет.

Различают культуральные свойства:

1. Размеры колонии. Она может быть очень мелкой, мелкой, средней и большой. Диаметр измеряется в миллиметрах и может находиться в диапазоне от 0,1 до 5 и более. Колонии, не превышающие 1 мм в диаметре, называются точечными.
2. Цвет, а также способность к выделению красящего пигмента в окружающую среду.
3. Поверхность. Здесь определяют, является ли она гладкой, шероховатой, бугристой или же вовсе складчатой.
4. Профиль колонии : выпуклая, конусовидный или просто плоский.
5. Структура колонии. Она может быть однородной, струйчатой, крупнозернистой или мелкозернистой.
6. Оптические свойства : прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, флуоресцирующая, матовая или блестящая;
7. Консистенция. Колония может быть вязкой или жидкой, тестообразной или пленчатой, маслянистой или хрупкой.
8. Край колонии : ровный, лопастной, ризоидный, волнистый, зубчатый .

**День 6 (08.03.19)**

**Работа с дневником производственной практики.**

**День 7 (09.03.19)**

**Микробиологическая диагностика кишечного дисбактериоза**

Образец кала, доставленный в лабораторию, разводила физиологическим раствором, обрабатывала на центрифуге и высевала на специальные питательные среды-агары (Мюллера-Хитона, селенитовый бульон, магниевую среду; для культивирования – среды Плоскирева, Эндо и Левина (одна из них градиентная), КА, среду Цейсслера, среду Сабуро, среду Блаурткаили тиогликолевый бульон и др)). Затем чашки со средами ставила в термостат, где создаются благоприятные условия для роста и размножения микроорганизмов. Через 5-7 дней врачи оценивают результат.

Участвовала в проведение внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований.

**День 8 (11.03.19)**

**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 Streptococcuspyogenes образует мелкие мутноватые круглые колонии. В бульоне стрептококк дает придонно-пристеночный рост в виде хлопьев, оставляя среду прозрачной. 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. Выявленную культуру стрептококка проверяют на чувствительность к антибиотикам методом дисков.

**Прием биоматериала**

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

**День 9 (12.03.19)**

**Микробиологическая диагностика**

**Pseudomonas aeruginosa**

Исследуемый материал (слизь из зева и носа , отделяемое раны) . Возбудители хорошо растут на простых питательных средах. На МПА образуют колонии размером 2-5 мм, круглые, полупрозрачные, голубовато-серые с перламутровым оттенком. На жидкой питательной среде (МПБ) бактерии образуют характерную серовато-се­ребристую пленку на поверхности. На кровяном агаре вокруг колоний синегнойной палочки наблюдаются зоны гемолиза.

Возбудитель довольно часто находится в патологическом материале в ассоциации с другими микроор­ганизмами, поэтому для выделения чистой культуры синегнойной палочки применяют селективные или дифференциально-диагнос­тические питательные среды с добавлением антисептиков — малахитовый агар с добавле­нием бриллиантового зеленого. Оптимальная температура роста 37 °С, однако синегнойная палочка способна расти при 42 °С, что позволяет отличать ее от других псевдомонад.

При культивировании на плотных пита­тельных средах P. aeruginosa продуцирует триметиламин, придающий культурам этих бактерий своеобразный сладковатый запах жасмина, земляничного мыла или карамели. Характерным биологическим признаком бак­терий вида P. aeruginosa является способность синтезировать водорастворимые пигменты, окрашивающие в соответствующий цвет по­вязки больных или питательные среды при их культивировании. Чаще всего они выраба­тывают феназиновый пигмент — пиоцианин сине-зеленого цвета.

**День 10 (13.03.19)**

**Приготовление питательных сред**

Готовила элективную среду- ЭНДО, для выявления возбудителей кишечных инфекций. Разливала среду в 25 чашек Петри. Стерилизовала в течение 30 минут при t° 110.

**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 (14.03.19)**

**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.

**День 12 (15.03.19)**

**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 13 (16.03.19)**

**Работа с дневником производственной практики**

**День 14 (18.03.19)**

 **Исследование смывов с рук и объектов**

**окружающей среды**

Брала смывы в урологическом отделении с поверхностей предметов обихода , а также смывы с рук медицинской сестры.

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 25 см2.

**День 15 (19.03.19)**

**Прием биоматериала**

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

**Микробиологическое исследование**

**Escherichia coli**

Материалы (исключая кровь) высевала 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 и створаживает молоко.

**Дезинфекция**

После завершения работы проводила дезинфекцию рабочего места ветошью с дезинфицирующим раствором.

В конце рабочего дня перчатки обработала антисептиком и утилизировала в отходы класса Б. Руки мыла с мылом.

**День 16 (20.03.19)**

**Санитарно- микробиологическое исследование воздуха Аспиратором ПУ-1Б**

Исследование воздуха производила в отделении урологии.

Аспиратор ПУ-1Б предназначен для автоматического отбора проб биологических аэрозолей воздуха при проведении санитарного контроля воздуха различных помещений в больницах, поликлиниках, медицинских научно-исследовательских институтах и других медицинских учреждениях. Устройство обеспечивает отбор проб аэрозолей на плотную питательную среду импакционным осаждением. Отобранные пробы анализируются в лабораторных условиях с применением стандартных методик, утвержденных в установленном порядке. Диаметр аэрозольных частиц, улавливаемых с эффективностью 50%, не менее 1,4 мкм.

## Устройство и работа ПУ-1Б

ПУ 1Б состоит и двух основных узлов, конструктивно объединенных в общем блоке: пробоотборника, в качестве которого используется однокаскадный импактор, и аспиратора-центробежного вентилятора. Управление режимами отбора проб осуществляется электронной схемой, выполненной на печатной плате.

### Работа устройства ПУ-1Б заключается в следующем:

При включении аспиратора с помощью кнопки "Пуск" центробежный вентилятор просасывает пробу воздуха из атмосферы через многосопловую решетку импактора. Аэрозольные частицы определенного размера, содержащиеся в пробе воздуха, импактируются на плотную питательную среду, залитую в стандартную стеклянную чашку Петри. Затем воздух выбрасывается в атмосферу через кольцевую щель корпуса. Контроль за объемом отбираемой пробы осуществляется автоматически при помощи электронного счетного устройства, смонтированного на печатной плате. При достижении определенного количества оборотов вентилятора, соответствующих заданному объему отбираемой пробы (которое заранее задано на дисплее), происходит автоматическое отключение вентилятора.

###  Подготовка чашек Петри

1. Подготовка чашки Петри в соответствии с утвержденной в установленном порядке методикой (В стандартную стеклянную чашку Петри заливается 20-21 мл питательной среды. При этом поверхность агара будет находиться в 3мм от нижней плоскости многосопловой решетки).
2. Сниммаем верхнюю часть корпуса пробоотборника, для чего поворачиваем ручку против часовой стрелки до отделения от нижней части корпуса. Снимаем защитную крышку, для чего нажимаем на 2 фиксатора.
3. Увлажняем многосопловую решетку этиловым спиртом с обеих сторон и профломбируем ее в пламени спиртовки до полного сгорания спирта на решетке.
4. Установливаю чашку с питательной средой в держатели пробоотборника и наворачиваю верхнюю часть корпуса, соблюдая осторожность, чтобы не повредить резьбу. Прибор готов к эксплуатации.

**Порядок работы устройства ПУ 1Б**

1. Включить блок питания в сеть 220В, 50Гц и включить тумблер питания (при использовании аспиратора ПУ-1Б исп.1 со встроенным аккумулятором можно включить прибор только тумблером).
2. Установить соответствующий объем отбираемой пробы (100 или 250л)
3. Нажать кнопку "Пуск". После выполнения заданного режима аспиратор выключится.
4. После отбора пробы снимите чашку Петри, закройте ее крышкой и поместите в термостат для образования колоний.
5. При исследовании 1м3 воздуха равноценно могут использоваться два режима отбора указанного объема: отбор на одну чашку Петри путем пропускания над ней 250л воздуха четыре раза подряд или отбор с подстановкой на каждые из четырех 250л воздуха новой чашки Петри.

**Определение концентрации микроорганизмов в исследуемом воздухе**

Анализ пробы производится путем визуального подсчета колоний микроорганизмов на поверхности агара, количество которых соответствует числу частиц, содержащих живые микроорганизмы (колонииобразующие единицы, КОЕ) в отобранном объеме воздуха.

В пробах с числом колоний, приближающихся к числу сопел решетки, возрастает вероятность ошибки, связанной с попаданием 2-х или более микроорганизмов на подложку непосредственно под соплом и образованием из них одной колонии. Количество уловленных микроорганизмов при этом оказывается заниженным.

При количестве колоний, не превышающих 35-и, наиболее вероятное число частиц равно числу колоний. С увеличением количества колоний в отобранной пробе расчеты должны производиться с использованием специальной таблицы.

**День 17 (21.03.19)**

**Прием биоматериала**

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

**Приготовление желточно-солевого агара**

ЖСА- элективная для стафилококков среда.

Для изготовления ЖСА к стерильному, расплавленному иохлажденному до 48°С МПА (рН 7,2 7,4) с 7,5- 10% натрия хлорида добавляла 15- 20% по объему стерильнойжелточной эмульсии (из хорошо вымытого и обожженного спиртом яйца извлекают желток и разбивают его в150 - 200 мл стерильного физраствора).

Среду быстро перемешивала и разливала в чашки Петри (60 шт).

**Среда Сабуро**

Селективная питательная среда для выращивания патогенных грибков.

Готовую среду разливала во флаконы (30 шт) и ставила стерилизовать в течение 20 мин при температуре 112оC

**День 18 (22.03.19)**

**Приготовление сред**

**Сахарный бульон**

Данная среда используется для исследования крови на стерильность, а также для стрептококков и других бактерий. К МПБ добавляла 40% стерильный раствор глюкозы. Разливала во флаконы (60 шт) и ставила стерилизовать в течение 30 мин при температуре 112оC.

**Кровяной агар**

Среда для выявления микроорганизмов, вызывающих гемолиз. К расплавленному и охлажденному до 45 °С МПА (2% агара) стерильно добавляла 5-10% дефибринированной стерильно взятой крови человека.

Среду быстро перемешивала и разливала в чашки Петри (25 шт)