**ТЕХНИКА 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, искусcтвенные ногти, ювелирные украшения;
* Работать с неисправным оборудованием;
* Оставлять включенным в сеть приборы, за исключением некоторых, которые могут находиться в круглосуточном режиме работы;
* Есть в неположенном 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.

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.

Подпись студента \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**День 1**

Место прохождения практики – КГБУЗ «Красноярская межрайонная детская клиническая больница №1», бактериологическая лаборатория, г. Красноярск, ул. Тельмана, 49.

**Прохождение инструктажа по ТБ**

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. Если есть повреждения кожи на руках, то их следует заклеить пластырем.

Запрещено:

* Использовать покрытие лаком для ногтей, искусcтвенные ногти, ювелирные украшения;
* Работать с неисправным оборудованием;
* Оставлять включенным в сеть приборы, за исключением некоторых, которые могут находиться в круглосуточном режиме работы;
* Есть в неположенном месте;
* Пипетировать ртом;
* Переливать кровь, сыворотку и другие биологические жидкости из сосуда в сосуд через край;
* Прикасаться руками к исследуемому биоматериалу, конденсату воды в засеянных чашках;
* Размещать посевы патогенных бактерий непосредственно на столах;
* Оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри и другую посуду с инфекционным материалом по окончании работы.

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.

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 проторгола 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 кожным антисептиком
3. Слизистые глаз, носа и рта обработать препаратами из аварийной аптечки
4. Защитную одежду снять, погрузить в дезраствор
5. Открытые части тела протереть антисептиком, в глаза закапать раствор антибиотиков
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 дезредством 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 обеззраживают бактерицидными лампами
* Сотрудник, проводивший дезинфекцию, выходит в коридор, снимает одежду, помещает ее в дезраствор
* Через 2 ч. убирают помещение, после чего работа возобновляется

1. **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
5. **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

Были ознакомлены 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".

**Дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты**

**Дезинфекция** — это комплекс мероприятий, направленный на уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний и разрушение токсинов на объектах внешней среды. В бактериологической лаборатории проводится профилактический вид дезинфекции. Также выделяют следующие методы дезинфекции:

* *Механический* — мытье рук, влажная уборка, очищение воздуха установками;
* *Физический* — воздействие пара, сухого жара, ультрафиолетового облучения, ошпаривание, кипячение, пастеризация, проглаживание утюгом, обжиг, прокаливание;
* *Химический* — дезинфекция с помощью специальных дезинфицирующих средств методом: погружения объекта в рабочий раствор; протирания; орошения; распыления.
* *Биологический* — заключается в антагонистическом действии биологической природы между разными микроорганизмами. Не применяется в данной лаборатории.
* *Комбинированный* — сочетание нескольких методов дезинфекции. Методы дезинфекции выбираются в зависимости от поставленной цели.

Для дезинфекции в лаборатории применяются следующие дезинфицирующие средства: Абактерил 0,5% раствор (годен 35 суток), СТГ Премиум 0,022% раствор (годен 40 суток), Индисепт ИЗО, Проклин антисептик, спирт 70%. Дезинфекции подвергаются отработанный биоматериал, инструментарий, рабочее место, руки.

**Стерилизация –** полное уничтожение всех видов микроорганизмов, их вегетативных форм на каких-либо предметах или материалах.

Выделяют следующие способы стерилизации:

1. Физические (обработка под высокой T°C, УФ-лучами)
2. Химические
3. Биологические (использование антибиотиков)
4. **Физические способы**
5. **Фламбирование** – прокаливание в пламени горелки (бактериологические петли, шпатели, предметные стекла, мелкие инструменты)
6. **Воздушная стерилизация** с помощью воздушного стерилизатора ГП-80. Применяется для стерилизации стеклянной посуды. Запрещается стерилизация изделий из текстиля, ваты, резины.

Посуду неплотно загружают в стерилизатор, дверь плотно закрывают, включают прибор, доводят до необходимой Т °С и стерилизуют установленное время. После выключают обогрев, но дверцу не открывают, пока не остынет воздух.

Таблица 1. Режимы работы воздушного стерилизатора ГП-80

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № программы | Наименование программы | Температура, °С | Время выдержки, мин |
| 1 | Стерилизация | 160 | 150 |
| 2 | 180 | 60 |
| 3 | Сушка | 85 | - |

1. **Стерилизация паром под давлением – автоклавирование –** наиболее распространенный и эффективный метод стерилизации. Он основан на воздействии насыщенного водяного пара на стерилизуемые материалы при давлении выше атмосферного. К работе с автоклавом допускаются только обученные лица.

Автоклавируют медицинские инструменты, лабораторную посуду, питательные среды, изделия из текстиля, отработанный биоматериал.

Таблица 2. Режимы автоклавирования

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель манометра, атм | Температура, °С | Время выдержки, мин |
| 0.5 | 110 | 20/30 |
| 1 | 121 | 15 |
| 1 | 121 | 30 |
| 2 | 132 | 45 |

Контроль стерилизации проводят с помощью индикаторных бумаг ВИНАР и СанИС. Они содержат красители, изменяющие свой цвет, что свидетельствует об успешном процессе.

Индикаторы предназначены для контроля условий стерилизации внутри упаковок и стерилизуемых изделий в паровых стерилизаторах всех типов при всех режимах. Помещаются внутрь стерилизуемых изделий и упаковок.

**Утилизация отработанного материала** проводится по требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Согласно классификации, медицинские отходы делятся на 5 классов:

* *Класс А (неопасные)* - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными, нетоксичные отходы. Пищевые отходы всех подразделений ЛПУ кроме инфекционных (в т.ч. кожно-венерологических), фтизиатрических. Мебель, инвентарь, неисправное диагностическое оборудование, не содержащие токсичных элементов. Неинфицированная бумага, смет, строительный мусор и т.д. Белый пакет или любого другого цвета, кроме желтого и красного.
* *Класс Б (опасные)* - потенциально инфицированные медицинские отходы. Материалы и инструменты, загрязненные выделениями, в т.ч. кровью. Выделения пациентов. Патолого-анатомические отходы. Органические операционные отходы (органы, ткани и т.п.). Все отходы из инфекционных отделений (в т.ч. пищевые). Отходы из микробиологических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Биологические отходы вивариев. Пакет желтого цвета.
* *Класс В (чрезвычайно опасные)* - материалы, контактирующие с больными особо опасными инфекциями. Медицинские отходы из лабораторий, работающих с микроорганизмами 1-2 групп патогенности. Отходы фтизиатрических, микологических больниц. Отходы от пациентов с анаэробной инфекцией. Красный пакет.
* *Класс Г* - медицинские отходы, по составу близкие к промышленным (токсикологически опасные): просроченные лекарственные средства, отходы от лекарственных и диагностических препаратов, дезсредства, не подлежащие использованию, с истекшим сроком годности. Цитостатики и другие химпрепараты. Ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование. Пакет черного цвета.
* *Класс Д (радиоактивные отходы)* - все виды отходов, содержащие радиоактивные компоненты. Маркируется знаком радиоактивности.

В бактериологической 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). Отходы следует наполнять в пакеты не более ¾ по объему. Контейнеры маркируют надписью класса отходов, пакеты - надписью класса отходов, наименованием медицинского учреждения, отделением, ответственным лицом и датой сбора.

**Дни 2-8**

**Приготовление питательных сред**

Для культивирования микроорганизмов применяются специальные субстраты – питательные среды, которые создают оптимальные условия для жизнедеятельности возбудителей. Выделяют следующие требования к ним: питательность сред, изотоничность, стерильность, обладание необходимым окислительно-восстановительным потенциалом, унифицированность.

Существуют различные классификации питательных сред:

1. По исходным компонентам:

|  |  |
| --- | --- |
| Натуральные среды | Синтетические среды |
| Из продуктов животного и растительного происхождения (костная и рыбная мука, дрожжи, сгустки крови и др.) | Из х.ч. органических и неорганических соединений точно указанных концентраций |

1. По консистенции (плотности):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Жидкие | Плотные | Полужидкие |
|  | Готовят из жидких, добавляя агар-агар/желатин | |
| Мясо-пептонный бульон (МПБ) | Мясо-пептонный агар (МПА), агар Эндо, агар Плоскирева, цитрат-агар Симмонса | Полужидкий агар с глюкозой, полужидкий агар с маннитом |

1. По составу:

|  |  |
| --- | --- |
| Простые среды | Сложные среды |
| МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера | Кровяной агар |

1. По назаначению:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид среды | Назначение | Пример |
| Основные | Культивирование большинства микробов | МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера |
| Специальные | Выделение и выращивание бактерий, не растущих на простых средах | Среды с добавлением сахара (стрептококк), сыворотки крови (пневмо- и менингококк) |
| Элективные | Выделение определенного вида (способствуют его росту и подавляют рост других видов) | Среды с теллуритом калия (коринебактерии и стафилококк), висмут- сульфитный агар (сальмонеллы), среда Плоскирева (сальмонеллы и шигеллы) |
| Дифференциально-диагностические | Диффиренцирование одного вида от другого по ферментативной активности | Среды Гисса, среда Эндо, среда Левина, агар Симмонса, ацетатный агар, агар Клиглера, среда Преуса (с мочевиной), среды с аминокислотами (лизин, аргинин, фенилаланин, орнитин) |

Перед приготовлением питательных сред организуют рабочее место. Подготавливают дистиллированную воду, мерные стаканы, посуду для варки сред определенного объема (эмалированную или алюминиевую), электронные весы. Выделяют этапы приготовления сред: 1) варка, 2) установление оптимальной величины рН, 3) осветеление, 4) фильтрация, 5) разлив, 6) стерилизация, 7) контроль.

Все среды приготавливают согласно инструкции, указанной на упаковке. Взвешиваютустановленное количество грамм среды на электронных весах и размешивают в небольшом количестве дистилированной воды, доливают оставшийся объем воды и ставят на печь. Варят, следуя инструкции (до вскипания, 2 мин, 10 мин после вскипания и др.). Разливают среды в чистые сухие пробирки (3-5 мл или 10 мл), флаконы, колбы, стерильные чашки Петри не более чем на 2/3 емкости. Посуду закрывают ватно-марлевыми пробками, поверх надевают бумажные колпачки. Маркируют посуду со средами, указывая название среды, дату приготовления.

Стерилизация сред зависит от состава и указана в ее рецепте, возможна стерилизация автоклавированием.

Для контроля готовых сред их ставят в термостат на 2 суток и просматривают: при отсутствии роста их считают стерильными.

Хранят готовые среды в холодильниках.

Были приготовлены и разлиты во флаконы, пробирки и вый агар. Готовые флаконы, пробирки со средами отправлены для автоклавирования.

После застывания посуда со средами маркируется (название среды, дата приготовления).

Приготовление скошенного агара: пробирки с 4-5 мл стерильной расплавленной среды укладывают в наклонном положении так, чтобы среда не заходила за 2/3 пробирки.

Также были подготовлены и промаркированы флаконы с физиологическим раствором.

**Дни 9-11**

**Прием, регистрация биоматериала**

В лаборатории исследуемыми материалами являются испражнения, отделяемое из зева, грудное молоко, моча.

Биоматериал доставляют в специальных контейнерах.

Поступающий биоматериал регистрируют в журналах регистрации (указывают ФИО пациента, рег.№, ...дата)

**Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (кишечных)**

Одной из основных групп возбудителей инфекционных заболеваний, которую исследуют в лаборатории, является семейство энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*). Его представители вызывают острые кишечные инфекции. Все кишечные бактерии – Гр(-) палочки, факультативные анаэробы, хорошо растущие на простых питательных средах.

Выделяют:

1. Условно-патогенные бактерии (37 видов различных родов): клебсиеллы, протей, синегнойная палочка и др.
2. Патогенные бактерии: ЭПКП, возбудители дизентирии, сальмонеллеза, брюшного тифа, иерсиниозов и др.

*Семейство Enterobacteriaceae, род Escherichiа, вид Энтеропатогенная кишечная палочка(ЭПКП):*

Короткие Гр (-) подвижные палочки, хорошо растущие на простых питательных средах при 37°С и рН 7,2-7,8. Иногда образуют капсулу, спор не образуют.

Факультативные анаэробы. На МПА – мутноватые, выпуклые влажные колонии, на МПБ – равномерное помутнение.

Дифференциально-диагностические среды – Эндо 37°С -24ч (малиново-красные колонии), ЭМС (темно-фиолетовые колонии).

Ферментативные свойства:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид | Тест | | | | | | | |
| Сероводород | Уреаза | Лактоза | Глюкоза | Индол | Симмонса цитрат | Подвижность | Ацетатный агар |
| ЭПКП | - | - | - | КГ | + | - | + | + |

Исследуемый материал – испражнения, рвотные массы.

*Семейство Enterobacteriaceae, род Shigella*

Небольшие неподвижные Гр(-) палочки с закругленными концами, спор и капсул не имеют.

Факультативные анаэробы, не прихотливые к питательным средам. Рост на МПА и МПБ при 37°С и рН 7,2-7,4. Элективные и диффиренциально-диагностические среды – Эндо, Плоскирева, ЭМС. Образуют полупрозрачные сероватые круглые колонии. Среды обогащения – селенитовый бульон, магниевая среда.

Ферментативные свойства:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид, группа | Тест | | | | | | | | |
| Лактоза | Глюкоза | Сахароза | Маннит | Мальтоза | Молоко | Желатин | Индол | Сероводород |
| А Григорьева-Шиги | - | К | - | - | К | К | - |  | - |
| В Флекснера | - | К | - | К | К | К | - | +/- | +/- |
| С Бойда | - | К | - | К | К | К | - | - | - |
| D Зонне | К | К | К | К | К | К | - | - | - |

Исследуемый материал – испражнения. *Семейство Enterobacteriaceae, род Salmonella*

Мелкие подвижные Гр(-) палочки с закругленными концами, спор и капсул не образуют.

Факультативные анаэробы, не требовательные к питательным средам. Хороший рост на МПА и МПБ при 37°С , рН 7,2-7,4. На МПА – нежные полупрозрачные выпуклые блестящие колонии, на МПБ – равномерное помутнение. На висмут-сульфитном агаре – колонии черного цвета. На дифференциально-диагностических средах Эндо, ЭМС, Плоскирева – бесцветные колонии. Среды обогащения – селенитовый бульон, среда Мюллера. Элективные среды: желчь (10-20%), среда Раппопорт.

Исследуемые материалы – испражнения, кровь, моча, дуоденальное содержимое.

**Дни 12-15**

**Дисбактериоз. Этапы исследования**

Дисбактериоз — качественное и количественное изменение состава нормальной микрофлоры кишечника. Факторами, способствующими развитию дисбактериоза, являются нарушения переваривания и всасывания, оперативные вмешательства и нарушения двигательной активности кишечника, прием антибиотиков, глюкокортикостероидов и цитостатиков, иммунологические нарушения.

Состав нормальной микрофлоры кишечника

|  |  |
| --- | --- |
| Название теста | Референтные значения |
| Патогенные микробы семейства кишечных (*Shigella spp.* и *Salmonella spp.)* |  |
| Типичные *E. coli* (лактоза +)  *E. coli* (лактоза -)  *E. coli* (гемолитические) | 10^7 – 10^8  Менее 10^5  0 |
| *Proteus* | Менее 10^2 |
| Другие УП энтеробактерии | Менее 10^4 |
| Неферментирующие бактерии | Менее 10^3 |
| Энтерококк | 10^5 - 10^7 |
| Стафилококки гемолитические (*S. аureus* и др) | - |
| Стафилококки (сапрофитный, эпидермальный) | 10^4 |
| Бифидобактерии | 10^9 - 10^11 |
| Лактобактерии | 10^6 - 10^8 |
| Бактероиды | Менее 10^7 |
| Клостридии | 10^3 |
| Дрожжевые грибы | 10^3 |

Методика исследования кала на дисбактериоз

Для определения качественного и количественного содержания микрофлоры кишечника производится бактериологическое исследование. Материалом исследования служат испражнения. Для забора материала используется стерильный контейнер, куда собираются фекалии (в пределах грамма). Проба должна быть доставлена в лабораторию не позднее 2 часов с момента забора (в исключительных случаях допускается более поздняя доставка при условии охлаждения пробы при температуре 2–4° С). После определения количества фекалий в эту же посуду добавляют девятикратное к весу фекалий количество растворителя (0,85% раствора хлорида натрия или фосфатно-буферного раствора), соотношение материала и растворителя должно быть 1:10. Получают исходное разведение 10^1 (1:10). После тщательно эмульгируют материал с помощью стеклянной палочки, в течение 5 мин дают осесть нерастворившимся частицам и из основного разведения делают ряд последующих (1:100; 1:1000; 1:10000 и т. д. до разведения 10^8–10^10). Каждое разведение кала готовят стерильной пипеткой. Из соответствующих разведений делают посевы на среды Эндо, Плоскирева, Левина, Сабуро, желточно- солевой агар (ЖСА), МПА с 5% крови и др., а также на свежескошенный агар по Шукевичу (для обнаружения роста протея) и в среды накопления (например, магниевая, селенитовая), из которых через 24 ч инкубации в термостате делают последующие высевы на соответствующие среды. Для выделения анаэробов используют среды Блаурокка, Вильсона — Блера, молоко и др. Учет результатов производят через соответствующие временные промежутки, например, Эндо, Плоскирева, Левина, МПА помещают в термостат при 37° С на 24 ч, на средах МРС, ЖСА, кровяном агаре посевы просматривают через 48–72 ч. Наличие роста на средах Блаурокка и Сабуро может наблюдаться от 3 до 10 сут при хранении посевов при комнатной температуре и т. д. Среды, наиболее часто используемые для выделения некоторых видов бактерий, приведены в таблице.

Среды, используемые для выделения бактерий кишечника:

|  |  |
| --- | --- |
| **Микроорганизмы** | **Питательные среды** |
| Бифидобактерии | Блаурокка |
| Эшерихии | Эндо, Эндо с 2,5% кровью, желчно-кровяной агар |
| Лактобактерии | Молоко |
| Другие ассоциации энтеробактерий | Эндо, Плоскирева, Левина |
| Протей | Скошенный агар по Шукевичу |
| Клостридии | Вильсона — Блера |
| Энтерококки | Желчно-кровяной агар, Эндо, кровяной агар |
| Стафилококки | ЖСА |
| Кандиды | Сабуро |

Для получения сосчитываемого числа колоний, на плотные среды в чашках Петри наносят 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с последующим втиранием материала шпателем; в жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки выcоким столбиком, вносят 1 мл взвеси на 9 мл. Предлагаемая схема посева различных разведений кала представлена в таблице.

Таблица. Схема посева (разведение до 10-10) на различные среды

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| N | Титр разведения | Питательные среды |
| 1 | 10-1 | Плоскирева, ЖСА, Сабуро, Эндо, скошенный агар по Шукевичу, магниевая или другая среда для накопления энтеробактерий |
| 2 | 10-2 | Вильсона — Блера (2 пробы), глюкозная среда |
| 3 | 10-3 | Эндо |
| 4 | 10-4 | ЖСА, Сабуро, Блаурокка |
| 5 | 10-5 | Вильсона — Блера (2 пробы) |
| 6 | 10-6 | Эндо, желчно-кровяной, молоко, Вильсона — Блера (2 пробы) |
| 7 | 10-7 | Блаурокка, молоко |
| 8 | 10-8 | Эндо, молоко |
| 9 | 10-9 | Блаурокка, молоко |
| 10 | 10-10 | Блаурокка |

Идентификация и определение количества микроорганизмов в 1 г испражнений проводят по известным методикам. На среде Плоскирева отбирают колонии, подозрительные на патогенные или условно-патогенные энтеробактерии: нежные, прозрачные, бесцветные с ровными или неровными краями. Отобранные колонии засевают на среду Олькеницкого (скошенный столбик) для дальнейшей идентификации. На среде Эндо с 2,5% крови подсчитывают как общее количество колоний, так и количество лактозонегативных и гемолизирующих колоний. Затем рассчитывают количество кишечных палочек в 1 г фекалий, для чего количество колоний умножают на 10 (так как для посева взято 0,1 мл материала), на 100 при 2-м разведении, на 1000 — при 3-м и т. д. Далее рассчитывают процентное соотношение, принимая общее количество кишечных палочек за 100%. Окончательный результат количественного содержания бактерий в 1 г испражнений дается как среднее арифметическое из всего количества колоний, выросших на всех чашках, для чего сумму колоний, выросших на всех чашках, делят на количество исследуемых чашек. Биохимическую идентификацию и серологическое типирование отобранных культур проводят по известным методикам для исключения или подтверждения принадлежности выделенных штаммов к энтеропатогенным эшерихиям. На среде Эндо могут расти и патогенные бактерии (Salmonella, Shigella, патогенные E. сoli), а также условно-патогенные: клебсиеллы, энтеробактер, протей и другие энтеробактерии, псевдомоны и др. Подозрительные колонии отбирают и подвергают дальнейшему изучению. Кроме этого на среде Эндо хорошо растет синегнойная палочка (Pseudomonas aeruginosa). На ЖСА учитывается общее количество выросших колоний. Затем отбирают различные виды колоний, микроскопируют и подвергают дальнейшему изучению с помощью различных тестов. При выделении S. еpidermidis дают их количественную характеристику, количество S. аures не определяют. На среде Сабуро исследуются колонии, характерные для грибов рода Кандида, которые подвергают микроскопии и дальнейшей идентификации. Количество микроорганизмов характеризуется разведением материала, который дал рост грибов. Энтерококки изучают с помощью энтерококкагара, желчно-кровяного агара, энтерококковой дифференциально-диагностической среды (ЭДДС). Рассчитывают общее количество в 1 г фекалий и соотношение штаммов Str. faecalis и Str. faecium. На скошенном МПА обращают внимание на ползучий рост и гнилостный запах, характерные для микроба рода Proteus. Количество микроорганизмов характеризуют разведением материала, который дал рост. На среде Блаурокка отмечают наличие роста в виде тяжей, «сапожных гвоздиков», ромбов и т. п., характерного для бифидобактерий, после чего культуру микроскопируют. Количество бифидобактерий характеризуют разведением материала. Для выделения молочнокислых бактерий может использоваться среда МРС-4. Количественный учет можно также производить титрованием молока, засеянного исследуемым материалом. Для определения клостридий используют среду Вильсона — Блера. Ставят две пробы: гретую (при 70° С в течение 15 мин) и негретую. В случае почернения среды с гретой пробой, ее подвергают дальнейшей идентификации.

*Схема проведения анализа по дням исследования*

I день: приготовление разведений фекалий и засев материала на плотные элективные и дифференциальные питательные среды (Плоскирева, ЖСА, Эндо, Эндо кровяной, желчно-кровяной, Сабуро, скошенный МПА по Шукевичу), на среды Вильсона — Блера (2 пробы: гретая и негретая), Блаурокка, молоко. Параллельно с прямым посевом испражнений делают посев на среды обогащения. Мы рекомендуем для накопления сальмонелл магниевую среду. Производится подготовка чашки с глюкозной средой для определения антагонистической активности исследуемой флоры.

II день: просмотр чашек Петри, изучение выросших колоний, пересев подозрительных колоний со сред Эндо, Плоскирева на среду Клиглера; характеристика роста на скошенном МПА по Шукевичу (наличие или отсутствие ползучего роста), высев со среды накопления на плотные питательные среды (висмут-сульфитная среда); снятие подозрительных колоний с желчно-кровяного агара, с Эндо с кровью на кровяной агар; просмотр пробирок со средой Вильсона — Блера, пересев подозрительных колоний.

III день: просмотр чашек со средами ЖСА (микроскопия, постановка тестов: плазма, маннит и др.), Сабуро (микроскопия; дальнейшая идентификация), кровяной агар (микроскопия, дальнейшая идентификация, биохимический ряд для идентификации энтерококков: молоко с синькой, маннит, ЭДДС, EF-агар), просмотр чашек на анаэробы, учет результатов роста на скошенной среде Клиглера (мазки, агглютинация), постановка пестрых рядов.

IV день: учет результатов биохимических тестов на стафилококки, энтерококки, энтеробактерии, анаэробы. Определение вида кандид. Постановка чувствительности к антибиотикам выделенных культур. Просмотр чашек с висмут-сульфитной средой, снятие подозрительных колоний на среду Клиглера. Посев на чашку с глюкозной средой музейных патогенных культур (S. typhi murium, Sh. sonnei, S. aureus и др.) для определения антагонистической активности исследуемой микрофлоры.

V день: просмотр пробирок со средой Блаурокка (микроскопия), титрование молока и количественный учет молочно-кислых палочек; учет чувствительности к антибиотикам выделенных культур; отбор подозрительных культур со среды Клиглера, агглютинация, постановка пестрых рядов, чувствительности к антибиотикам выделенных культур; просмотр среды Вильсона — Блера, при почернении среды с гретой культурой — постановка пестрого ряда (молоко с синькой, глюкоза, лактоза, маннит, сахароза, дульцит, мальтоза; МПА кровяной, ЖСА). Учет антагонистической активности.

VI день: идентификация выделенных культур, высеянных со среды накопления, учет чувствительности к антибиотикам выделенных культур. Идентификация клостридий по классическим методикам. Выдача окончательного ответа.

Все штаммы, подозрительные по культуральным и биохимическим признакам в отношении принадлежности к патогенным энтеробактериям, должны быть идентифицированы серологически.

**Иммунодиагностика: РА, РСК, РП**

Выявление в биоматериале антигенов бактерий является одним из основных способов диагностики инфекционных болезней, а обнаружение специфических антигенов у изолятов микроорганизмов позволяет идентифицировать их на родовом, видовом и серотиповом уровнях. Наиболее широко применимы в лабораторной практике иммунологические реакции: реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК).

**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)** – разновидность РА. Обладает высокой чувствительностью. С помощью РПГА можно: 1) определить антитела в сыворотке крови больного, к которой добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум; 2) определить наличие антигенов в исследуемом материале.

При положительной реакции пассивно склеенные эритроциты покрывают дно лунки ровным слоем с фестончатыми краями (зонтик); при отрицательной – эритроциты скапливаются в центральном углублении лунки, образуя компактную «пуговку» с резко очерченными краями.

**Реакция связывания комплемента (РСК)**

Антитела, взаимодействуя с соответствующим антигеном, связывают добавленный комплемент (1-я система). Индикатором связывания комплемента служат эритроциты, сенсибилизированные гемолитическй сывороткой, т. е. антителами к эритроцитам (2-я система). Если комплемент не фиксируется в 1 системе, т.е. не происходит реакция антиген-антитело, то сенсибилизированные эритроциты полностью лизируются (отрицательная реакция). При связывании комплемента иммунными комплексами 1-й системы после добавления сенсибилизированных 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.

Методика: в чашки Петри разливают агар Мартена (12-15 мл), сохраняя прозрачность. После застывания агара накладывают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной противодифтерийной антитоксической 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.