**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.

**Подпись\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Дни 1-3 (06.05.19-08.05.19)**

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

Проходила инструктаж по технике безопасности.

Вся лаборатория работает согласно требованиям:

* СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами;
* СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность";
* СанПин 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней"

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.

**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:

1. Применяют дезраствор, эффективный в отношении возбудителя
2. 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
3. Воздух и поверхности обеззраживают бактерицидными лампами
4. Сотрудник, проводивший дезинфекцию, выходит в коридор, снимает одежду, помещает ее в дезраствор
5. Через 2 ч. убирают помещение, после чего работа возобновляется
6. **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.

Была ознакомлена с правилами работы в бактериологической лаборатории. Вся работа в бактериологической лаборатории проводится согласноСанПиН 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".

**Дни 4-8 (09.05.19.-13.05.19)**

**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  |

2)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 и др. |

1. По составу:

|  |  |
| --- | --- |
| Простые среды | Сложные среды |
| МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера | ЖСА, шоколадный, кровяной агар- получают путем добавления к питательной среде 5–10% подогретой стерильной дефибринированной крови барана, кролика лошади, человека. Среда используется для выделения стрептококков, пневмококков и других бактерий, а также для изучения гемолитической активности.  |

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 (способствует 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 | Дифференцирование одного вида от другого вида по ферментативной активности  | Среды Гисса, среда Эндо(дифференциальная среда для выделения энтеробактерий по способности использовать лактозу), среда Левина, агар Симмонса, Ацетатный агар, агар Клиглера, среда Преуса(с мочевиной), среды с аминокислотами (лизин, аргинин, фенилаланин , орнитин) |
| Консервирующие | Первичный посев и транспортировка материала  | Глицериновая смесь |

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 . 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 9-10 (14.05.19.-15.05.19.)**

**Прием, регистрация биоматериала**

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

Биоматериал доставляют в специальных контейнерах.

Поступающий биоматериал регистрируют в журналах регистрации (указывают ФИО пациента, возраст, отделение, рег.№, ...дата взятия/поступления)

Выполняла окраску мазков по Грамму.

**Методика окраски по Грамму.**

1. Помещают на мазок полоску фильтровальной бумаги и наносят на фиксированный мазок несколько капель карболовый раствор генцианвиолета, и выдерживают 2-3 минуты. Сливают краску, удаляют фильтровальную бумагу и ополаскивают в проточной воде (до 30 сек).
2. Мазок заливают на 1-2 мин ратворомЛюголя до почернения препарата. Раствор сливают, мазок промывают водой (водопроводной или дистиллированной).
3. Дифференцируют 96% спиртом, наливая и сливая его, пока отходит синяя краска и не обесцветится мазок (приблизительно 20-60 секунд). Во время дифференцировки препарат все время покачивают. Если вместо спирта использовать ацетон, то промывание продолжается 30 сек. Можно дифференцировать смесью спирта и ацетона (1:1) 30 с. Тщательно промывают стекло в проточной или дистиллированной воде 1-2 мин.
4. Для выявления грамотрицательной группы бактерий препараты дополнительно окрашивают раствором Фуксина (несколько капель) в течение 2-3 минут.
5. Промывают в проточной воде и высушивают фильтровальной бумагой.

Окрашенные мазки исследуют в масле, с иммерсионным объективом; при желании заключаются в бальзам, в таком случае на окрашенный и хорошо высушенный мазок кладут каплю бальзама и покрывают покровным стеклом.

Результат окраски:

Грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет (темно-синий), а грамотрицательные- розово-красный, красный или коричневый.

**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:

Исследуемый материал – испражнения, рвотные массы.

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

*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 | - | - | - |
| DЗонне | 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.

Ферментативные свойства:

|  |  |
| --- | --- |
| Вид | Тест |
| Лактоза | Глюкоза  | Сахароза  | Маннит | Мальтоза  | Индол | Сероводород | Лакмусовое молоко | Желатин |
| *S. typhi* | - | К | - | К | К | - | + | К | - |

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

**Дни 11-12 (16.05.19.-18.05.19)**

**Иммунодиагностика: РА, РСК, РП, РИФ, РНГА.**

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.

Выполняла РА на стекле с эширихиозными сыворотками



Представляют собой жидкие или лиофилизированные иммунные сыворотки ,полученные из крови кроликов или баранов , гипериммунизированных корпускулярными антигенами Escherichia coli следующих ОК групп :

|  |
| --- |
| ОКА: О18:К77, О20:К84, О25:К11, О26:К60, О33:К-, О44:К74, О55:К59, О86:К61, О111:К58,О125:К70, О142:К86, «408».ОКВ: О20:К84, О26:К60, О55:К59, О111:К58ОКС: О33:К-, О86: К61, О119:К69, О125:К70, О126:К71, О127: К63, О128:К67ОКЕ: О124:К72, О142:К86, О143:К-, О144:К-, О151:К-.ОКД: О18:К77, О25:К11, О44:К74, О75:К95, О114:К90, О142:К86, О143:К-, О151:К-, «408». |

## 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

1) для обнаружения полисахаридов, белков, экстрактов бактерий и других высокодисперстных веществ, риккетсий и вирусов, комплексы которых с агглютининами в обычных РА увидеть не удается,

2) для выявления антител в сыворотках больных к этим высокодисперстным веществам и мельчайшим микроорганизмам.

Под непрямой, или пассивной, агглютинацией понимают реакцию, в которой антитела взаимодействуют с антигенами, предварительно адсорбированными на инертных частицах (латекс, целлюлоза, полистерол, оксид бария и др. или эритроциты барана, I(0)-группы крови человека)

**Постановка**. В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроли). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарногодиагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч.

**Учет**. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка.



## Реакция связывания комплемента (РСК)

Антитела, взаимодействуя с соответствующим антигеном, связывают добавленный комплемент (1-я система). Индикатором связывания комплемента служат эритроциты, сенсибилизированные гемолитической сывороткой, т. е. антителами к эритроцитам (2-я система). Если комплемент не фиксируется в 1 системе, т.е. не происходит реакция антиген-антитело, то 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.



## Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) (метод Кунса)

Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом. Реакция Кунса является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.
Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.
Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами.

В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.



**Дни 13-15 (19.05.19.-21.05.19)**

**Санитарная микробиология : исследование воздуха**

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха проводят для определения количества МАФАнМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) в 1 м3 и качественного состава (наличие санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов). МАФАнМ в воздухе определяют посевом на поверхность МПА, а количество санитарно-показательных микробов (стафилококков и стрептококков) определяют посевом на кровяной и желточно-солевой агар. Для определения наличия плесневых грибов и дрожжей применяют среды Сабуро и Чапека.

Существует много методов бактериологического исследования воздуха. Самыми доступными и чаще применяемыми являются методы Коха и Кротова.

 ***Седиментационный метод Коха.***Сутьметода заключается в **осаждении** **микробных частиц** и капель аэрозоли на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести.

**Методика**: чашки Петри с МПА и средой Сабуро оставляют открытыми на 5-20 мин в классе, в цехах молочного завода, мясокомбината (время экспозиции зависит от предполагаемой загрязненности). Чашки закрывают и помещают в термостат при 300С, если это МПА или кровяной агар, их культивируют в течение 48 часов; если это среда Сабуро – культивирование проводят при 250С в течение 4-7 суток. Затем проводят подсчет выросших колоний бактерий и плесневых грибов во всей чашке.

После подсчета выросших колоний в чашке Петри, определяют количество микроорганизмов в 1 м3 воздуха по формуле Омелянского, согласно которой **предполагаетс**я (**т.е. это не точный метод**), что в чашки с питательной средой площадью 100 см2, в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха. Для определения количества бактерий в 1м3 воздуха применяют формулу Омелянского:

А . 100 . 1000 . 5

Х = --------------------

в . 10 . Т

где Х – количество микробов в 1 м3 (1000 л) воздуха;

А – число колоний выросших на МПА в чашках;

в – площадь чашки (78 см2);

5 – время экспозиции по правилу Омелянского;

Т – время, в течение которого чашка была открыта;

10 –10 л воздуха по правилу Омелянского;

1000 – 1 м3 воздуха;

100 - 100 см2 питательной среды.

 ***Аспирационный метод микробиологического исследования воздуха*** с применением прибора ***Кротова*** основан на использовании ударного действия воздушной струи, протянутой через щель прибора, на поверхность МПА в чашках Петри. Этот метод является более точным, т.к. прибор снабжен микроманометром (или ротаметром), показывающим количество литров посеянного воздуха. Аппарат Кротова – это цилиндрический прибор, внутрикоторого имеется электромотор с центробежным вентилятором. При вращении вентилятора воздух засасывается из исследуемого помещения через узкую клиновидную щель в крышке прибора. Под крышкой прибора находится вращающаяся платформа с открытой чашкой Петри, струя воздуха ударяется о поверхность питательной среды, на которую оседают микроорганизмы из воздуха. Чашки с посевами помещают в термостат на 24-48 ч при 300С, затем подсчитывают количество колоний в чашке и по формуле определяют число микробов в 1м3 воздуха исследуемого помещения:

а . 1000

Х = -----------

в

где Х – число микробов в 1 м3 (1000 л) воздуха;

а - число колоний, выросших на МПА в чашках;

1000 л = 1 м3 воздуха;

в - количество литров воздуха, пропущенного через щель прибора.

**Микробиологические нормативы санитарного состояния воздуха**

**производственных помещений**(исследуют 1 раз в месяц)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Методисследования | МАФАнМ, КОЕ.Не более | Плесневые грибы, КОЕ.Не более |
| 1 | 2 | 3 |
| Метод Кротова | 150 колоний в 100 л | 15 колоний в 100л |
| Метод Коха | 200 колоний за 20 мин | 20 колоний за 20 мин |

**Санитарная микробиология исследование смывов с рук и объектов**

**окружающей среды**

 Объектами исследования при проведении бактериологического контроля лечебно-профилактических учреждений являются:

воздушная среда;

* различные объекты внешней среды;
* хирургический инструментарий;
* шовный материал;
* руки хирургов и кожа операционного поля.

 Бактериологическое исследование микробной обсемененности предметов внешней среды предусматривает выявление стафилококка, синегнойной палочки, бактерий группы кишечных палочек и патогенных грибов.

Отбор проб

 Взятие смывов производят стерильным ватным тампоном на палочках, вмонтированных в пробирки, или марлевыми салфетками размером 5x5 см. Для увлажнения тампонов в пробирки с тампонами наливают по 2,0 мл стерильного физиологического раствора.

 Для выделения стафилококков посев делают непосредственно на чашку Петри с желточно-солевым агаром, для выделения бактерий группы кишечных палочек — посев на среду Эндо (дальнейшие исследования по соответствующим схемам).

 Для обнаружения патогенных грибов производят посев на среду Сабуро, наблюдают 5 суток при 21°С. Кроме того, производят посевы в среды накопления — для стафилококков в 6,5% хлористого натрия, для бактерий группы кишечных палочек — в 10—20% желчный бульон. Через сутки инкубирования при 37°С делают пересев на среду Эндо и жел-точно-солевой агар. При обнаружении подозрительных колоний производят их микроскопию и далее исследуют по соответствующим схемам.

Для выявления синегнойной палочки специальные посевы можно не производить, так как она дает ползущий рост с характерным запахом земляничного мыла на среде Эндо.

 Правила отбора проб для контроля стерильности в лечебно-профилактических учреждениях

Забор проб производят в стерильные емкости с соблюдением строжайших правил асептики.

 Посев в обязательном порядке производят в три питательные среды:

* сахарный бульон Хоттингера (0,5 и 1% глюкоза);
* тиогликолевую среду;
* бульон Сабуро.

 При посеве изделия или его части непосредственно в питательную среду следует соблюдать следующее условие — среды должно быть достаточно для полного погружения изделия.

 Перед посевом емкость с отобранными образцами протирают стерильной марлевой салфеткой, обильно смоченной 6% раствором перекиси водорода, и оставляют на 30 минут. Затем вносят в бокс. За 1,5—2 часа до начала работы в боксе и предбокснике на 1—1,5 часа включают бактерицидные лампы.

 Перед входом в бокс работники лаборатории тщательно моют руки теплой водой с мылом и щеткой, вытирают стерильным полотенцем, надевают в предбокснике на ноги бахилы, стерильные халаты, 4-слойные маски, шапочки, стерильные перчатки.

 Посевы в бульон Хоттингера и тиогликолевую среду выдерживают в термостате при температуре 37°С, среду Сабуро — при температуре 20—22°С.

 Посевы инкубируют в термостате в течение 14 суток.

 Материал стерилен при отсутствии роста во всех посевах. Материал не стерилен при росте микрофлоры.

 Бактериологический контроль эффективности обработки кожи операционного поля и рук хирургов

 Смывы с кожи операционного поля и рук хирургов производят стерильными марлевыми салфетками размером 5x5 см2, смоченными в физиологическом растворе. Марлевой салфеткой тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук. После забора проб марлевую салфетку помещают в широкогорлые пробирки или колбы с раствором нейтрализатора (воды или физиологического раствора) и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 минут, производят отмыв марлевой салфетки. Отмывную жидкость засевают глубинным способом по 0,5 мл на 2 чашки Петри с мясопептонным агаром, а марлевую салфетку— 0,5% сахарный бульон. Посевы инкубируют при 37°С в течение 48 часов.

 Кожа и руки стерильны при отсутствии роста микроорганизмов как на твердой, так и на жидкой питательной среде.

**Дни 16-18 (22.05.19.-25.05.19)**

**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 137℃-27 минут, 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 при 137℃ -27 минут, УФ-лучами)
2. Химические
3. Биологические (использование антибиотиков)

**Физические способы**

1. **Фламбирование** – прокаливание в пламени горелки (бактериологические петли, шпатели, предметные стекла, мелкие инструменты)
2. **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 |

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.