

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Фармацевтический колледж

## Дневник

преддипломной практики  
по разделу «Теория и практика лабораторных микробиологических и  
иммунологических исследований»

Тамониной Ольги Вячеславовны

---

ФИО

Место прохождения практики

ДО

---

(медицинская организация, отделение)

с «\_12\_» \_\_мая\_\_ 2020 г. по «\_08\_» \_\_июня\_\_ 2020 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Воронина С.В. (зав. Бак. Лаб)

Методический – Ф.И.О. (его должность) Жукова М.В.

Красноярск, 2020

## Содержание

1. Цели и задачи практики
2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики
3. Тематический план
4. График прохождения практики
5. Инструктаж по технике безопасности
6. Содержание и объем проведенной работы
7. Манипуляционный лист (Лист микробиологических исследований)
8. Отчет (цифровой, текстовой)

### **Цели и задачи практики:**

1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений и навыков по методам микробиологических и иммунологических исследований.
2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических умений по методам микробиологических и иммунологических исследований.
3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.
4. Осуществление учета и анализ основных клинико-диагностических показателей, ведение документации.
5. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной ответственности.
6. Изучение основных форм и методов работы в КДЛ.

### **Программа практики.**

*В результате прохождения практики студенты должны уметь самостоятельно:*

1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных исследований.
2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование для анализов.
3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.
4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды, стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.
5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего биоматериала.
6. Регистрировать проведенные исследования.
7. Вести учетно-отчетную документацию.
8. Пользоваться приборами в лаборатории.

### **По окончании практики студент должен представить в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ЛПУ.
2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ЛПУ.

3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).
4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате преддипломной практики обучающийся должен:**

**Приобрести практический опыт:**

- приготовления питательных сред для культивирования различных групп микроорганизмов с учетом их потребностей
- техники посевов на чашки Петри, скошенный агар и высокий столбик агара.

**Освоить умения:**

- готовить материал к микробиологическим исследованиям;
- определять культуральные и морфологические свойства;
- вести учетно-отчетную документацию;
- производить забор исследуемого материала;
- принимать, регистрировать, материал;
- утилизировать отработанный материал.

**Знать:**

- задачи, структуру, оборудование, правила работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории;
- основные методы и диагностическое значение исследований протеолитических, сахаралитических, гемолитических свойств микроорганизмов, антигенной структуры.

## Тематический план

№	Наименование разделов и тем практики	Всего часов
	<b>Проведение лабораторных микробиологических исследований</b>	<b>144</b>
1	Ознакомление с правилами работы в бак лаборатории	6
2	Подготовка материала к микробиологическому исследованию: прием , регистрация биоматериала	6
3	Приготовление питательных сред общеупотребительных, элективных, дифференциально-диагностических для выделения возбудителей гнойно-воспалительных, кишечных и нозокомиальных инфекций.	12
4	Иммунодиагностика : РА, РП, РСК,РИФ,ПЦР	12
5	Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (гнойно-воспалительных, кишечных)	36
6	Микробиологическая диагностика возбудителей госпитальных инфекций.	36
7	Дисбактериоз. Этапы исследования .	12
8	Санитарно – бактериологическое исследование воздуха, смывов.	12
9	Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.	6
<b>10</b>	<b>Дифференцированный зачет</b>	<b>6</b>
<b>Вид промежуточной аттестации</b>		<b>Дифференцированный зачет</b>

### График прохождения практики

<b>№ п/п</b>	<b>Дата</b>	<b>Часы</b>	<b>оценка</b>	<b>Подпись руководителя</b>
1	12.05.2020	9:00-15:00		
2	13.05.2020	9:00-15:00		
3	14.05.2020	9:00-15:00		
4	15.05.2020	9:00-15:00		
5	16.05.2020	9:00-15:00		
6	18.05.2020	9:00-15:00		
7	19.05.2020	9:00-15:00		
8	20.05.2020	9:00-15:00		
9	21.05.2020	9:00-15:00		
10	22.05.2020	9:00-15:00		
11	23.05.2020	9:00-15:00		
12	25.05.2020	9:00-15:00		
13	26.05.2020	9:00-15:00		
14	27.05.2020	9:00-15:00		
15	28.05.2020	9:00-15:00		
16	29.05.2020	9:00-15:00		
17	30.05.2020	9:00-15:00		
18	01.06.2020	9:00-15:00		
19	02.06.2020	9:00-15:00		
20	03.06.2020	9:00-15:00		
21	04.06.2020	9:00-15:00		
22	05.06.2020	9:00-15:00		
23	06.06.2020	9:00-15:00		
24	08.06.2020	9:00-15:00		

## День 1. Ознакомление с лабораторией

Ознакомление с микробиологической лабораторией ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» и изучила инструктаж по технике безопасности ППИ №03-30.15-78.

Документы, на основании которых ведутся работы в микробиологической лаборатории:

- 1) Инструкция ИОТ № 03-30.15-95 по режиму безопасной работы с объектами и материалами, содержащими или подозрительными на содержание патогенными биологическими агентами III-IV групп, в лаборатории микробиологических исследований филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» в городе Ачинске;
- 2) Инструкция о мерах пожарной безопасности в лабораториях микробиологических исследований Бюджетного учреждения;
- 3) Инструкция ИОТ № 01-26/27-87 по правилам безопасной ликвидации аварий при работе с патогенными биологическими агентами при проведении микробиологических и паразитологических исследований;
- 4) Инструкция по соблюдению санитарно-эпидемиологических требований к обращению с медицинскими отходами в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории;
- 5) Инструкция КДЛ Техника отбора проб биоматериалов и правила их транспортировки и бактериологический отдел клинко-диагностической лаборатории.

Отдел представляет блок помещений, изолированный от прочих подразделений запирающимися дверьми.

Электроснабжение, теплоснабжение, водоснабжение и водоотведение лаборатории — централизованные. Имеется система приточно-вытяжной вентиляции с механическими побудителями воздуха с фильтрами очистки на входе и выходе.

Лаборатория делится на «чистую» и «заразную» зоны.

«Чистая» зона:

1. Кабинет зав. лабораторией;
2. Средоварочная;
3. Комната для мед-персонала;
4. Моечная;
5. Чистая автоклавная
6. Кладовая уборочного инвентаря.
7. Санузел.

«Заразная» зона:

1. Кабинет для приема проб;
2. Посевной кабинет;
3. Кабинет для просмотра и описания культур;
4. Кабинет для изучения неспецифической микрофлоры с боксом;
5. Кабинет санитарной микробиологии с боксом;
6. «Заразная» автоклавная;
7. Кладовая уборочного инвентаря «заразной» зоны.

Коридор «чистой» и «заразной» зоны разделен дверьми, перемещение персонала из зоны в зону осуществляется через санпропускник.

Основными видами деятельности микробиологической лаборатории согласно установленного перечня номенклатуры исследований являются:

Исследование особо опасных инфекций:

1. Биологический метод:

- определение ботулотоксина (исслед. мат. – продукты питания);

2.

Микробиологический метод:

- бак. посев на иерсиниоз и псевдотуберкулез (исслед. мат. – отделяемое зева, фекалии);

3.

Серологический метод (РНГА, РА):

- на кишечный иерсиниоз ОЗ, О9, псевдотуберкулез (исслед. мат. – сыворотка крови);
- на эпидемический сыпной тиф реакция Провачека (исслед. мат. – сыворотка крови);
- на бруцеллез реакция Райта-Хеддельсона (исслед. мат. – сыворотка крови);

4. Метод ПЦР (обнаружение ДНК/РНК):

- иерсиниоз, псевдотуберкулез (исслед. мат. – фекалии);
- лептоспироз (исслед. мат. – кровь, моча);
- клещевой риккетсиоз (исслед. мат. – кровь с ЭДТА);
- клещевой вирусный энцефалит исслед. мат. (– кровь с ЭДТА, ликвор, моча, фекалии);
- иксодовые клещевые боррелиозы (исслед. мат. – кровь с ЭДТА, ликвор, моча, фекалии);



### Микробиологические исследования:

1. Бактериологические, вирусологические, паразитологические исследования клинических материалов от человека;
2. Санитарно-микробиологические, санитарно-вирусологические, паразитологические диагностические исследования клинических материалов от человека:
  - продовольственного сырья и пищевых продуктов;
  - воды (питьевой, расфасованной в емкости, открытых водоемов);
  - почвы, песка, снега, воздуха.
3. Серологические исследования на выявление антигенов и антител к возбудителям инфекционных и паразитарных заболеваний, бруцеллеза, сыпного тифа, дифтерии, дизентерии, сальмонеллез, брюшного тифа, иерсиниозов, клещевого вирусного энцефалита, клещевого боррелиоза, лямблиоза, трихинеллеза, описторхоза и других инфекций, и инвазий, определение столбнячного и дифтерийного токсина и антитоксина;
4. Молекулярногенетические исследования с целью выявления ДНК (РНК) возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы;
5. Токсикологические исследования методом биотестирования на гидробионтах и во дорослях;
7. Определение суммарной мутагенной активности в воде (в т. ч. расфасованной в емкости), воздухе, промышленных и бытовых отходах.
8. Исследования выполняются на определение широкого спектра микроорганизмов (в том числе бактерий, вирусов, простейших и гельминтов) III-IV групп патогенности.

### Вирусологические диагностические исследования клинических материалов от человека:

- Энттеровирусы (исследуемый материал – спинномозговая жидкость, смыв с ротоглотки, фекалии);
- Исследование биологических материалов на грипп (методом РИФ);
- Носоглоточный мазок на вирусы гриппа, ОРВИ (культура клеток).

### Санитарно-вирусологические исследования:

- воды (в том числе питьевой, открытых водоемов).

### Серологические исследования -

на выявление антигенов и антител к возбудителям инфекционных и паразитарных

заболеваний, в том числе клещевого вирусного энцефалита, клещевого боррелиоза, гриппа и ОРВИ, кори, краснухи, лямблиоза, трихинеллеза, описторхоза, лихорадка Западного Нила, рота-, нора-, астровирусы и других инфекций.

## День 2. Техника безопасности

1. На работу в микр. лабораторию принимаются лица не моложе 18 лет;
2. С принимаемыми на работу лицами проводят первичный вводный инструктаж на рабочем месте по вопросам охраны труда и режима работы лаборатории.
3. Все виды инструктажа и обучения должны проводиться согласно «Инструкции о проведении инструктажа по безопасным приемам и методам работы в учреждениях системы Минздрава»
4. Распаковка материала, присланного для исследования, проводится с соблюдением мер предосторожности: банки и пробирки, содержащие материал, обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы или штативы.
5. Посев инфекционного материала в пробирки и чашки Петри производят вблизи от огня горелки с обжиганием петли, пипетки, краев пробирки.
6. Во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, а пробирки – в штативы. Размещение посевов патогенных бактерий непосредственно на столах недопустимо.
7. Насасывание в пипетки растворов химических реактивов и жидкостей, содержащих возбудителей инфекционных заболеваний, производят с помощью резиновой груши, насасывание ртом не допускается.
8. С целью контроля за загрязнением воздуха в санитарно-гигиенических отделениях лабораторий следует периодически брать анализы на вредные вещества, а в боксах микробиологических лабораторий – не менее 2 раз в неделю на патогенные микроорганизмы.

### **Инструкция для медицинского работника, ответственного за прием материала:**

1. Принять от пациента материал, оценить качество и объем полученного образца;
2. Если материал имеет удовлетворительное качество, образец регистрируется, маркируется, промаркированный флакон помещается в штатив;
3. Внести необходимые данные в «Журнал регистрации диагностического материала».

На основании приказа управления здравоохранения администрации Красноярского края от 09.07.01. №297 «О профилактике профессионального заражения» при возникновении аварийной ситуации необходимо немедленно:

- 1. При порезе или проколе инструментом, контактирующим с биологическими жидкостями:**

1. Снять перчатки;
2. Если идет кровь – не останавливать;
3. Если крови нет, то выдавить несколько капель крови, обработать ранку 70% спиртом, вымыть руки под теплой водой с двукратным намыливанием, а затем обработать 5% спиртовым раствором йода

### **2. При попадании биологических жидкостей:**

1. На незащищенную кожу – обработать кожу 70% спиртом, вымыть руки дважды с мылом под теплой водой, повторно обработать 70% спиртом;
2. В глаза – промыть под струей воды и закапать 1% водный раствор борной кислоты или 1% раствор азотнокислого серебра или промыть 0,05% раствором марганцовокислого калия;
3. В нос – промыть струей воды и закапать 1% раствором протаргола или обработать 0,05% марганцовокислого калия;
4. В рот – прополоскать водой, а затем 1% водным раствором борной кислоты или 0,05% марганцовокислого калия или 70% этиловым спиртом;

### **3. При аварии во время работы на центрифуге:**

1. Открывать крышку медленно и только спустя 40 минут после остановки;
2. Все центрифужные стаканы и разбитое стекло поместить в дез. раствор на 2 часа, центрифугу обработать дез. средством;
3. Следует поставить в известность врача, ответственного за организацию мед.помощи больным в данной территории, зав. отделением, старшую мед. сестру, и зарегистрировать данный факт в журнал аварийных ситуаций, который хранится на рабочем месте.

### **День 3. Прием и регистрация биоматериала**

Доставка биоматериала осуществляется в окне приема в термоконтейнере с последующим указанием в журнале времени доставки проб и непосредственной их маркировкой.

При транспортировке контейнеры с кровью и другим биоматериалом должны быть плотно закрыты, прочно установлены, чтобы предотвратить их опрокидывание. Также необходимо обеспечить соответствующий температурный режим, в зависимости от вида лабораторных исследований:

- курьер доставляет сумку с биоматериалом через входную дверь в помещение первого этажа. Извещает о доставке биоматериала звонком, который находится на перегородке.

- сотрудник отдела разбора должен принять термоконтейнер с биоматериалом у курьера через окно для передачи биоматериала и начать разбор.

- содержимое термоконтейнера: хладоэлементы, термометр, в штатив установлены вакутейнеры с кровью и мочой, в пакете находятся контейнеры с калом и пробирки на энтеробиоз, в другом пакете находятся контейнеры с мочой. В отдельных папках, маркированных кодом и наименованием контрагента, находятся направления на исследования, сопроводительная накладная, требование на расходные материалы (при необходимости).

- в сопроводительной накладной указывают количество отправляемых наименований емкостей с биоматериалом и количество бланков направлений. На сопроводительной накладной промаркирован трех- или четырехзначный код, уникальный для каждого, который соответствует первым цифрам штрих-кода, наклеенного на каждую емкость с биоматериалом и направление. Соотнесение биоматериала и принадлежности к отправившему его контрагенту основано на сопоставлении этого кода.

#### **Первичная сортировка биоматериала:**

Все емкости с биоматериалами, штативы с пробирками из термоконтейнера сотрудник отдела разбора должен поместить на стол для разбора биоматериала.

Открыть папку и достать из нее сопроводительную накладную, на которой поставить подпись для идентификации сотрудника, осуществившего прием и сортировку биоматериала, отметить время приезда курьера. Пересчитать бланки направлений, просмотреть правильность их оформления (отмечены исследования, присутствуют штрих-кода) и сверить с количеством, обозначенным в сопроводительной накладной.

Рассортировать полученный биоматериал по отделам. При сортировке емкостей по лоткам отделов можно ориентироваться на исследования, отмеченные в направлениях.

## День 4-5. 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.

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: варка, установление оптимальной величины рН, осветление, фильтрация, разлив, стерилизация, контроль.

Все среды готовят согласно инструкции, указанной на упаковке. Взвешивают установленное количество грамм среды на электронных весах.

Размешивают в небольшом количестве дистиллированной воды, затем ставят на печь. Разливают среды в чистые сухие пробирки либо 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 и 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 по истечении времени их считают стерильными. Хранят готовые среды в холодильниках.

### **Варка питательных сред:**

Среда Висмут-сульфит-ГРМ агар - питательная среда для выделения сальмонелл, сухая.

Висмут-сульфит-ГРМ агар Оболенск предназначен для бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии с целью выделения сальмонелл из исследуемого материала.

Висмут-сульфит-ГРМ агар представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета, получаемый смешиванием сухих компонентов. Выпускается в полиэтиленовых банках по 250 г.

Свежеприготовленная среда, благодаря бриллиантовой зелени и висмуту лимоннокислому, входящих в состав среды, обладает сильным ингибирующим эффектом в отношении сопутствующей микрофлоры.

Дифференцирующее действие среды основано на том, что образуемый бактериями из сульфата железа сероводород, вызывает почернение индикатора – цитрата висмута – вследствие перехода его в сульфид висмута, вещество черного цвета. Поэтому бактерии, образующие сероводород, формируют черные или черные с коричневым или темно-зеленым оттенком колонии, обладающие часто металлическим блеском. Среда под колониями, при этом, окрашена в черный цвет.

Висмут-сульфит-ГРМ агар обеспечивает на всех засеянных чашках Петри рост тест-штаммов сальмонелл и их четкую дифференциацию от кишечной палочки не позднее 48 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)$  °С. На среде отсутствует рост стафилококков, некоторых клебсиелл, подавляется рост протей и частично рост эшерихий.

#### **Приготовление среды Висмут-сульфит-ГРМ агар Оболенск:**

Порошок в количестве, необходимом для приготовления конкретной серии, тщательно размешивают в 1 л воды дистиллированной, кипятят при постоянном перемешивании в течение 3 мин до полного расплавления агара. Охлаждают до температуры 45-50 °С, взбалтывают, разливают в нестерильные чашки Петри слоем 4-5 мм и оставляют на рабочем столе с открытыми крышками для застывания и подсушивания среды в течение 90-100 мин при температуре 18-25 °С. Готовая среда в чашках непрозрачная зелено-желтого цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 3 суток при температуре хранения от 2 до 25 °С (хранить в защищенном от света месте).

#### **Приготовление среды Гисса:**

К 100 мл 1%-ой пептонной воды без селитры добавляют 0,5-1,0 % необходимого углевода или спирта (L- арабиноза, D- манноза, D- сахароза, L- инозит) и 1% индикатора Андрее или 0,1 мл 1,6%-го раствора бромтимолового синего. Готовые среды Гисса с индикатором Андрее светлые, при кислотообразовании краснеют. Среда с бромтимоловым синим зеленого цвета с травянистым оттенком, при кислой реакции- жёлтого цвета, при щелочной- синего.

#### **Приготовление среды Эндо:**

Приготовление питательной среды Эндо, предназначенная для выделения энтеробактерий. Для этого в средоварку заливается воды (1 литр), и насыпается взвешенное количество агара (37 г), закрываем и задаем параметры. Для каждой среды задаются свои параметры (температура стерилизации - 100 град., время стерилизации – 3 минуты, температура розлива – 45 град.).

## День 6-8. Иммунодиагностика

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 серологические реакции: реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК).

### **Реакция агглютинации:**

Агглютинация - это склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток под действием антител в присутствии электролита (изотонического раствора хлорида натрия). Группы склеенных бактерий (клеток) называют агглютинатом. Для реакции агглютинации необходимы следующие компоненты: антитела (агглютинины), которые находятся в сыворотке больного или иммунного животного, антиген - взвесь живых или убитых микробов, эритроцитов или других клеток, изотонический (0,9%) раствор хлорида натрия.

Реакцию агглютинации для серодиагностики применяют при брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля), при бруцеллезе (реакция Райта и Хеддлсона), туляремии. Антителом при этом является сыворотка больного, а антигеном известный микроб. При идентификации микробов или других клеток антигеном служит их взвесь, а антителом - известная иммунная сыворотка. Эту реакцию широко применяют для диагностики кишечных инфекций, коклюша и др.

Реакция агглютинации на стекле. На обезжиренное предметное стекло наносят две капли специфической (адсорбированной) сыворотки и каплю изотонического раствора хлорида натрия. Неадсорбированные сыворотки предварительно разводят в соотношении 1:5 - 1:100. Культуру петлёй или пипеткой тщательно растирают на стекле, а потом вносят в каплю изотонического, раствора хлорида натрия и в одну из капель сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси.

Внимание! Нельзя переносить культуру из сыворотки в каплю изотонического раствора хлорида натрия, которая является контролем антигена. Если контроль сыворотки остаётся прозрачным, в контроле антигена наблюдается равномерная муть, а в капле, где культура смешана с сывороткой, появляются хлопья агглютината на фоне прозрачной жидкости, результат реакции считается положительным.

«О» «К» Диагностическая Физиологический сыворотка +культура, раствор + культура.

### **Реакция преципитации:**

РП - это иммунная реакция взаимодействия антител с антигенами в присутствии



электролитов, причем антиген находится в растворимом состоянии. При преципитации происходит осаждение растворимых антигенов антителами, что проявляется помутнением в виде полос преципитации. Образование видимого преципитата наблюдается при смешивании обоих реагентов в эквивалентных соотношениях. Избыток одного из них снижает количество осаждающихся иммунных комплексов. Существуют различные способы постановки реакции преципитации.

**Реакция кольцепреципитации** ставится в преципитационных пробирках с малым диаметром. В пробирку вносят иммунную сыворотку и осторожно наклоняют растворимый антиген. При положительном результате на границе двух растворов образуется кольцо молочно-белого цвета. Реакция кольцепреципитации, с помощью которой определяют наличие антигенов в органах и тканях, экстракты которых кипятят и фильтруют, называется реакцией термопреципитации (реакция Асколи для определения термостабильного сибиреязвенного антигена).

#### **Реакция связывания комплемента:**

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело.

Если же комплекс антиген—антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

#### **РСК проводят в 2 фазы:**

1 фаза – инкубация смеси, содержащей три компонента антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз; реакция отрицательная.

РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса (реакция Вассермана).

### **Реакция иммунофлюоресценции:**

Иммунофлюоресцентная реакция является непрямым вариантом серологического исследования.

Начинается реакция с подготовки растворов, затем сыворотки и их контрольные образцы подвергаются титрованию. Подготовленные ранее разведения и их контрольные образцы аккуратно наносятся на предметные стёкла с антигеном. Потом препараты подвергаются инкубации, затем следует их отмывание и высушивание на воздухе. На стёкла с антигеном тонким слоем наносится антисыворотка, после этого производится вторичная инкубация препаратов и, вся предыдущая цепь действий повторяется, завершаясь высушиванием препарата. В результате препарат на предметном стекле подвергается обработке глицерином и исследуется в люминесцентном микроскопе.

Результаты проведённой реакции оцениваются по четырёх бальной шкале, которая характеризуется интенсивностью поверхностного жёлто-зелёного свечения клеток антигенов:

«+» очень слабое свечение клетки, заметное только на её периферии;

«++» слабое свечение периферии клетки, но с явно заметным зелёным оттенком;

«+++/++++» яркое свечение зелёного цвета периферии клетки Титром реакции считается такое разведение сыворотки, где не менее 50 % клеток антигена проявляют чёткое поверхностное свечение, то есть результат реакции +++ или +++. Значение титра реакции от 1/80 до 1/100.

**Полимеразная цепная реакция:** метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше

длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований.

## **День 11 -13. Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (гнойно-воспалительных, 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, иерсиниэнтероколитика, синегнойная палочка и др.
2. Патогенные бактерии: ЭПКП, возбудители дизентерии, сальмонеллеза, брюшного тифа и др.

### ***Семейство Enterobacteriaceae, род Escherichia, вид Энтеропатогенная кишечная палочка (ЭПКП)***

Короткие Гр (-) подвижные палочки, хорошо растущие на простых питательных средах при 37°C 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 (малиново-красные колонии), ЭМС (темно-фиолетовые колонии).

*Ферментативные свойства:*

	Серо од	Ур еа	Лакт	Glc	Индо л	Симмонс а цитрат	Подвижн ость	Ацетатный агар
ЭПКП	-	-	-	КГ	+	-	+	+

*Исследуемый материал – испражнения, рвотные массы.*

### ***Семейство Enterobacteriaceae, Род Salmonella, Вид S. enteritidis***

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°C, 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. Среда обогащения – селенитовый бульон, среда Мюллера. Элективные среды: желчь (10-20%), среда Раппопорт.

Ферментативные свойства:

Вид	Тест								
	Лакт	Glc	Сах	Маннит	Мальт	Индо л	Серово дород	Лакмусовое молоко	Желатин
<i>S. enteritidis</i>	-	К	-	К	К	-	+	К	-

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

**Семейство Enterobacteriaceae, Род Shigella, Вид S. dysenteriae**

Шигеллы - это небольшие (2-3 × 0,4-0,6 мкм) палочки с закругленными концами. Отличаются от остальных представителей семейства Enterobacteriaceae отсутствием жгутиков. Они не имеют спор и капсул. Грамотрицательны. Факультативные анаэробы. Неприхотливы к питательным средам. Размножаются на МПА и МПБ при температуре 37° С и рН 7,2-7,4. Элективными и дифференциально-диагностическими средами для них являются среды Плоскирева, Эндо, ЭМС. Растут в виде небольших, полупрозрачных, сероватых, круглых колоний, размером 15-2 мм в S-форме. Исключением являются шигеллы Зонне, которые часто диссоциируют, образуя крупные, плоские, мутные, с изрезанными краями колонии R-формы. В жидких питательных средах шигеллы дают равномерную мусть, R-формы образуют осадок.

Ферментативные свойства:

Вид шигелл, группа	Тест								
	лак-тоза	глю-коза	сахароза	ман-нит	маль-тоза	моло-ко	желатин	ин-дол	H <sub>2</sub> S
A Григорьева — Шиги Штутцера — Шмитца Лардж — Сакса	—	К	—	—	К	К	—	—	—
B Флекснера	—	К	—	К	К	К	—	±	±
C Бойда	—	К	—	К	К	К	—	—	—
D Зонне	К	К	К	К	К	К	—	—	—
	На 2—5-й день	На 5—6-й день							

Исследуемые материалы – испражнения, кровь

Подавляющее большинство гнойно - воспалительных заболеваний вызывают *кокки*, т.е. имеющие сферическую (шаровидную) форму микроорганизмы. Их делят на две большие группы - грамположительные и грамотрицательные. Внутри этих групп выделяют аэробные и факультативно - анаэробные кокки и анаэробные кокки.

Среди грамположительных аэробных и факультативно - анаэробных кокков наибольшее значение имеют микроорганизмы семейства *Micrococcaceae* (род *Staphylococcus*) и семейства *Streptococcaceae* (род *Streptococcus*), среди грамотрицательных аэробных и факультативно - анаэробных кокков - представители семейства *Neisseriaceae* (*N.gonorrhoeae* - гонококк и *N.meningitidis* - менингококк).

Представители семейства *Micrococcaceae*, способные вызывать заболевания у человека, относятся к родам *Staphylococcus*, *Micrococcus* и *Stomatococcus*.

### **Род *Staphylococcus*:**

В состав рода входит более 20 видов, из которых наибольшее значение имеют *S.aureus* (золотистый стафилококк), *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*.

Морфология. Грамположительные кокки, для которых характерно взаиморасположение скоплениями в виде гроздей винограда, т.к. они делятся во взаимоперпендикулярных плоскостях. Имеют микрокапсулу, спор не образуют, жгутиков не имеют.

Культуральные свойства. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Хорошо растут на простых питательных средах, в том числе на средах с 5- 10% NaCl. Температурный оптимум от +35 до +37° С, pH 6-8 (лучше слабощелочная реакция среды). На плотных средах образуют непрозрачные круглые (2-4 мм в диаметре) ровные колонии, окрашенные в цвет липохромного пигмента (кремовый, желтый, оранжевый). Кроме S- форм колоний могут образовывать R- формы. На жидких средах дают равномерное помутнение, затем выпадает рыхлый осадок.

Биохимические свойства. Обладают высокой биохимической активностью, образуют различные ферменты, во многом определяющие патогенность. Каталаза- положительны, оксидаза- отрицательны. Углеводы ферментируют до кислоты без газа, разжижают желатин с образованием воронки, образуют сероводород. По наличию коагулазы их делят на две группы - коагулаза- положительные и коагулаза- отрицательные. Среди патогенных видов коагулаза - положителен лишь *S.aureus*, остальные - отрицательны.

Антигенная структура очень сложная (более 50 типов антигенов). По специфичности антигены подразделяют на родовые (общие для стафилококков), перекрестнореагирующие (с изоантигенами эритроцитов, кожи и почки человека), видо- и типоспецифические.

Видоспецифическими антигенами являются тейхоевые кислоты, белок А золотистого

стафилококка. Антигенными свойствами обладают токсины.

Факторы патогенности. К ним относят микрокапсулу, компоненты клеточной стенки (теихоевые кислоты, белок А), ферменты и токсины.

1. Факторами адгезии являются высокие гидрофобные свойства поверхностных структур.

2. Компоненты клеточной стенки стимулируют развитие воспалительных реакций, основное значение в них имеют нейтрофилы.

3. Разнообразные ферменты стафилококков играют роль факторов агрессии и защиты. Главным фактором является плазмокоагулаза, свертывающая сыворотку (плазму) крови и образующая тромбиноподобное вещество, обвалакивающее стафилококки и препятствующее действию защитных реакций организма. Кроме нее - фибролизин, ДНК-аза, лецитиназа, фосфатаза.

### Стрептококки.

В семейство Streptococcaceae входит семь родов, из которых для человека наибольшее значение имеют стрептококки (род *Streptococcus*) и энтерококки (род *Enterococcus*). Наиболее значимые виды - *S.pyogenes* (стрептококки группы А), *S.agalactiae* (стрептококки группы В), *S.pneumoniae* (пневмококк), *S.viridans* (зеленящие стрептококки, биогруппа *mutans*), *Enterococcus faecalis*.

Морфология. Стрептококки (от греч. *streptos* - цепочка и *coccus* - зерно) - грамположительные цитохромнегативные бактерии шаровидной или овоидной формы, растущие чаще в виде цепочек, преимущественно неподвижные, не имеют спор. Патогенные виды образуют капсулу (у пневмококка имеет диагностическое значение). Факультативные (большинство) или строгие анаэробы.

Культуральные свойства. Стрептококки плохо растут на простых питательных средах. Обычно используют среды с кровью или сывороткой крови. Чаще применяют сахарный бульон и кровяной агар, содержащий 5% дефибринированной крови. На бульоне рост придонно - пристеночный в виде крошковатого осадка, бульон чаще прозрачен. На плотных средах чаще образуют очень мелкие колонии. Оптимум температуры +37° С, рН - 7,2-7,6. На плотных средах стрептококки группы А образуют колонии трех типов:

- мукоидные (напоминают капельку воды) - характерны для вирулентных штаммов, имеющих капсулу;
- шероховатые - плоские, с неровной поверхностью и фестончатыми краями - характерны для вирулентных штаммов, имеющих М- антигены;
- гладкие - характерны для маловирулентных штаммов.

Предпочитают газовую смесь с 5% CO<sub>2</sub>. Способны образовывать L- формы.

Для дифференциации стрептококков используют различные признаки: рост при +10° и 45° С, рост на среде с 6,5% NaCl, рост на среде с рН 9,6, рост на среде с 40% желчи, рост в молоке с 0,1% метиленовым синим, рост после прогревания в течение 30 мин. при 60° С. Наиболее распространенный *S.pyogenes* относится к 1 группе (все признаки отрицательны), энтерококки (3 группа) - все признаки положительны.

Существует ряд классификаций стрептококков. Наиболее проста классификация, основанная на особенностях роста этих микроорганизмов на агаре с кровью барана (по отношению к эритроцитам).

*Бета* - гемолитические стрептококки при росте на кровяном агаре образуют вокруг колонии четкую зону гемолиза, *альфа* - гемолитические - частичный гемолиз и позеленение среды (превращение окси- в метгемоглобин), *гамма*- гемолитические - на кровяном агаре гемолиза незаметно. Альфа - гемолитические стрептококки за зеленый цвет среды называют *S.viridans* (зеленящими).

Антигенная структура. Серологическая классификация имеет практическое значение для дифференциации имеющих сложное антигенное строение стрептококков. В основе классификации - *группоспецифические полисахаридные антигены клеточной стенки*. Выделяют 20 серогрупп, обозначенных заглавными латинскими буквами. Наибольшее значение имеют стрептококки серогрупп А, В и D.

У стрептококков серогруппы А имеются типоспецифические антигены - белки М, Т и R. По М- антигену гемолитические стрептококки серогруппы А подразделены на серовары (около 100).

Стрептококки имеют перекрестно - реагирующие антигены с антигенами клеток базального слоя эпителия кожи, эпителиальных клеток корковой и медуллярной зон тимуса. В клеточной стенке стрептококков обнаружен также антиген (рецептор II), способный взаимодействовать с Fc- фрагментом IgG.



## День 14 – 18. Микробиологическая диагностика возбудителей госпитальных инфекций

Внутрибольничные инфекции (также госпитальные, нозокомиальные) — согласно определению ВОЗ, любые клинически выраженные заболевания микробного происхождения, поражающие больного в результате его госпитализации или посещения лечебного учреждения (ЛПУ) с целью лечения, либо после выписки из больницы (например, раневая инфекция), а также больничным персоналом в силу осуществления им деятельности, независимо от того, проявляются или не проявляются симптомы этого заболевания во время нахождения данных лиц в стационаре.

Инфекция считается внутрибольничной, если она впервые проявляется через 48 часов или более после нахождения в больнице, при условии отсутствия клинических проявлений этих инфекций в момент поступления и исключения вероятности инкубационного периода. Госпитальные инфекции следует отличать от часто смешиваемых с ними смежных понятий ятрогенных и оппортунистических инфекций.

**Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*)** — вид шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков. Приблизительно 25—40 % населения являются постоянными носителями этой бактерии, которая может сохраняться на кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей.

*S. aureus* может вызывать широкий диапазон заболеваний, начиная с лёгких кожных инфекций: угри, импетиго (может быть вызван также и *Streptococcus pyogenes*), фурункул, флегмона, карбункул, абсцесс, пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис. Диапазон заболеваний простирается от кожных, мягких тканей, респираторных, костных, суставных и эндоваскулярных до раневых инфекций. Он до сих пор является одной из четырёх наиболее частых причин внутрибольничных инфекций, часто вызывая послеоперационные раневые инфекции.

**Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*)** — вид грамотрицательных подвижных палочковидных бактерий. Обитает в воде, почве, условно патогенна для человека, возбудитель нозокомиальных инфекций у человека. Лечение затруднительно ввиду высокой устойчивости к антибиотикам

*Pseudomonas aeruginosa* обнаруживается при абсцессах и гнойных ранах, ассоциирована с энтеритами и циститами. *P. aeruginosa* является одним из распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций ввиду того, что *P. aeruginosa* особенно легко поражает лиц с ослабленным иммунным статусом. Факторами патогенности *P. aeruginosa* является наличие подвижности, токсинообразование, продукция

гидролитических ферментов. Прогноз ухудшается высокой резистентностью к действию антибиотиков. *P. aeruginosa* устойчива к действию многих беталактамов, аминогликозидов, фторированных хинолонов.

Внутрибольничная пневмония (госпитальная пневмония, нозокомиальная пневмония) — пневмония, которая развивается через 48-72 часа после поступления больного в стационар и которая не существовала и не находилась в фазе инкубационного периода до момента поступления.

Нозокомиальная пневмония, связанная с ИВЛ, — пневмония, развившаяся не ранее чем через 48 часов от момента интубации и начала проведения ИВЛ, при отсутствии признаков легочной инфекции на момент интубации. Однако во многих случаях у хирургических больных манифестация нозокомиальной пневмонии возможна и в более ранние сроки.

Частота больничной пневмонии достигает 20 % от числа всех больничных инфекций и наблюдается чаще у больных после операций на грудной или брюшной полости, у больных, которые находятся на искусственной вентиляции лёгких и у больных с иммунодефицитом.

**Klebsiella pneumoniae** — вид грамотрицательных факультативно-анаэробных палочковидных капсульных неподвижных бактерий, относящийся к роду клебсиелл. Встречается повсеместно в окружающей среде, в том числе в почве и поверхностных водах.

Может вызывать различные инфекции, включая пневмонию, сепсис, инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, менингит и абсцессы в печени. Инфицированию обычными штаммами чаще подвержены люди с иммунодефицитами, однако обнаруживаются и гипервирулентные штаммы, поражающие здоровых людей.

Встречается на медицинских приборах и является частой причиной внутрибольничных инфекций. Бактерия приобрела известность благодаря обнаружению связанных с ней тяжёлых инфекций и увеличивающемуся дефициту способов лечения. Всё чаще встречаются штаммы, которые устойчивы к антибиотикам, применяемым в крайних случаях.

**Гемофильная палочка**, палочка Пфайффера, палочка инфлюэнцы (*Haemophilus influenzae*) — вид грамотрицательных неподвижных бактерий семейства *Pasteurellaceae*. Первоначально описана в 1892 году немецким бактериологом Рихардом Пфайффером как возбудитель инфлюэнцы (гриппа). Первый свободноживущий организм, чей геном был полностью секвенирован. Возбудитель так называемой гемофильной инфекции у человека.

***Mycoplasma pneumoniae*** — вид бактерий рода *Mycoplasma*. Как и все бактерии

этого рода, *M. pneumoniae* — мелкие микроорганизмы (0,3—0,8 мкм), не имеющие жёсткой клеточной стенки (в результате чего от внешней среды их отделяет лишь цитоплазматическая мембрана) и ярко выраженным полиморфизмом. Строгий аэроб. *M. pneumoniae* локализуется у людей в дыхательных путях, вызывая их воспаление, а также трахеобронхит и атипичную пневмонию. Чаще всего отмечается у детей.

*Legionella pneumophila* — грамотрицательная, подвижная палочковидная бактерия рода легионелл, возбудитель легионеллёза («болезнь легионеров»), название получила из-за вспышки заболевания в 1976 году среди делегатов съезда Американского легиона в гостинице, расположенной в Филадельфии. Возбудитель отнесён к III группе патогенности (до 2013 г. относился ко II группе патогенности, т.е. к группе возбудителей особо опасных инфекционных болезней).

## День 19-20. Дисбактериоз. Этапы исследования

В человеческом организме присутствует множество разнообразных микроорганизмов. Основным местом их скопления у человека является кишечник. Их число оценивается в  $10^{14}$  -  $10^{18}$  разнообразных микробов, а их объём занимает больше половины толстого кишечника. Это огромное число.

Учёными установлено, что в здоровом состоянии у человека микрофлора кишечника представляет сложную и сбалансированную систему из бифидобактерий, лактобактерий и кишечной палочкой с нормальными ферментными свойствами. Основной функцией микрофлоры, живущей в симбиозе с человеком, является защита организма от токсинов и вредных бактерий, выработка ферментов, необходимых для пищеварения, участие в обмене веществ, и защита от аллергенов проходящих через пищеварительный тракт.

Однако, не всё так просто, кроме полезных микробов в кишечнике присутствуют микроорганизмы, которые могут нанести вред здоровью человека в случае понижения иммунитета на фоне болезни или по иным причинам, их называют условно-патогенными (золотистый стафилококк, энтеробактерии). Другой группой, присутствующей в кишечнике, являются сапрофиты (энтерококки, дрожжи, эпидермальный и сапрофитный стафилококки и др.). Третья группа – транзитные микроорганизмы, попадающие в кишечник из внешней среды. Если человек здоров, то они покидают организм без следа.

Пока флора кишечника в норме и иммунитет силен, то проблем с этими группами не возникает, однако в случае заболеваний можно столкнуться с разнообразными нарушениями микроэкологии кишечника – дисбактериозом, дисбиозом, микробиоценозом. В международной научной литературе и медицинской практике данные состояния называются - микроэкологическими нарушениями микрофлоры кишечника.

В Отраслевом стандарте "Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника" (ОСТ 91500.11.0004-2003), Министерства здравоохранения РФ дано определение дисбактериоза кишечника.

Его рассматривают как клинико-лабораторный синдром, возникающий при различных заболеваниях и клинических ситуациях, характеризующихся изменениями в составе нормальной микрофлоры и появлением других различных микроорганизмов, влияющих на метаболические и иммунные функции организма.

Подобные изменения часто несут негативный характер и отрицательно сказываются на здоровье пациента. Для полноценной диагностики и определения причин нарушений используется бактериологическое исследование на дисбактериоз.

Целью бактериологического посева на дисбактериоз является определение состава микрофлоры в месте исследования. Т.е. все присутствующие микроорганизмы разбиваются

по родам и определяется их количество в объёме исследуемого материала. В результате анализа вы сможете точно узнать какие микроорганизмы «проживают» у вас в кишечнике и в каком количестве. А это является важнейшим шагом в диагностике заболевания или иного нарушения здоровья и назначением необходимого лечения или коррекции.

Материалом для исследования служат фекалии, которые привозит пациент. С особенностями подготовки к исследованию и графиком его приёма.

После поступления в лабораторию материал проходит следующие этапы исследования:

1. Подготовка материала к посевам;
2. Посев фекалий в разнообразные, заранее подготовленные среды (девять различных сред), каждая из которых направлена на выращивание определённого вида микроорганизмов. В стандартное исследование входит определение: Кишечной палочки (нормальной, со сниженной ферментативной активностью, гемолизирующей), Лактозонегативных энтеробактерий: Родов Протей; Клебсиелла; Цитробактер; Энтеробактер; Гафния; Серрация; Псевдомонады. Патогенных энтеробактерий: Родов Шигелла; Сальмонелла. Кокковые формы: Родов Стафилококки; Энтерококки; Стрептококки. Дрожжеподобных грибов Candida. Бифидобактерий. Лактобактерии.;

3. Оценка специалистом лаборатории количества и вида микроорганизмов проводится в течение 5 дней. Такой срок связан с необходимостью выделения и определения разных микроорганизмов в разный период, т.к. им нужны разные температуры и время для роста;

4. При обнаружении патогенных (вредоносных) и условно-патогенных микробов проводится дополнительное исследование на их восприимчивость к различным бактериофагам, антибиотикам и противогрибковым препаратам. Если у пациента не выделены микроорганизмы, требующие постановки чувствительности к бактериофагам, антибиотикам, противогрибковым препаратам, исследование не проводится;

5. После всех этих действий результаты анализа выдаются заказчику;

Т.к. бактериологический посев является многоэтапным исследованием, связанным со сроком выделения и определения различных микроорганизмов, то для проведения полноценного анализа требуется неделя.

На бланках указаны данные о норме содержания тех или иных микроорганизмов и их количестве в поступившем материале. Там же вы найдёте дополнительную информацию.

Однако, напоминаем, что правильно интерпретировать результат бактериологического посева на дисбактериоз в совокупности с другими анализами, историей болезни пациента и составить полную картину о заболевании с последующим

назначением коррекции или лечения микрофлоры кишечника должен только квалифицированный врач.

## День 21 - 22. Санитарно – бактериологическое исследование воздуха, СМЫВОВ

### Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды проводят в помещениях лечебных организаций в зависимости от их функционального назначения на санитарно-микробиологические показатели:

- общее количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха (КОЕ/м<sup>3</sup>);
- количество колоний *S. aureus* в 1 м<sup>3</sup> воздуха (КОЕ/м<sup>3</sup>);
- количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппаратов и устройств, разрешенных к применению в установленном порядке.

Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм<sup>3</sup> для определения общего количества микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов и 250 дм<sup>3</sup> для определения *S. aureus*. Исследование воздуха седиментационным методом не допускается. Для определения общего количества микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха забор проб проводят на питательный агар типа МПА, СПА, ГРМ-агар и другие, приготовленные согласно инструкций по применению. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение (48 ± 2) ч, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 м<sup>3</sup> воздуха. При наличии роста колоний дрожжевых и плесневых грибов, их подсчитывают и делают пересчет на 1 м<sup>3</sup> воздуха. В протоколе количество дрожжевых и плесневых грибов указывают отдельно.

При переносе аппаратов и устройств для отбора проб воздуха из одного помещения в другое их поверхность обрабатывают раствором дезинфицирующего средства. Столик, внутренние стыки, крышку и прочие части прибора с внутренней и внешней стороны протирают спиртом (70 %).

## Санитарная микробиология исследование смывов с рук и окружающей среды

### Исследования микробной обсемененности объектов внешней среды

Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды предусматривает определение стафилококков, бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, синегнойной палочки. Отбор проб с поверхностей различных объектов осуществляют методом смывов. По эпидемиологическим показаниям номенклатура исследований микробной обсемененности объектов внешней среды может быть расширена.

Взятие смывов производят стерильными ватными тампонами, смонтированными в пробирки. Для увлажнения тампонов в пробирки наливают по 2,0 мл стерильной 0,1 % пептонной воды с добавлением нейтрализаторов дезинфицирующих средств.

При контроле мелких предметов смывы забирают с поверхности всего предмета. При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят в нескольких местах исследуемого предмета общей площадью примерно 100 см<sup>2</sup>.

Для обнаружения стафилококков делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл 6,5 % солевого бульона. Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч, после чего делают высев на желточно-солевые среды на основе сред: элективно-солевой агар, стафилококкагар, манитолагар или среда № 10 по ГФ XII, агар Байд-Паркер. Для обнаружения бактерий группы кишечных палочек делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл среды Кесслера. Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение (24 ± 2) ч и делают пересев на среду Эндо. Выросшие колонии на среде Эндо подвергают дальнейшему изучению для установления их возможной принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Для обнаружения сальмонелл делают высев 0,2—0,3 мл смывной жидкости в пробирку с 5,0 мл одной из сред обогащения (магниева, селенитовая или среда Раппапорта-Вассилиадиса). Засеянные пробирки инкубируют при 37 °С в течение 18—20 ч, делают пересев на среду Эндо и висмут-сульфит агар с последующим отбором подозрительных колоний и их идентификацией.

Для обнаружения синегнойной палочки делают высев на среду № 8 (бульон для накопления стафилококков и синегнойной палочки) и среду № 9 (для определения синегнойной палочки по наличию пигмента пиоцианина) или питательные среды в соответствии с ГФ XII. Колонии, подозрительные на синегнойную палочку (колонии с ровными или слегка волнистыми краями, гладкой блестящей поверхностью с характерным запахом и пигментом, однако, следует учесть, что запах и пигмент могут сильно варьировать или вообще отсутствовать), пересевают на скошенный агар.

*P. aeruginosa* – грамотрицательная, подвижная, оксидазоположительная палочка,



окисляющая, но не ферментирующая глюкозу, дающая рост при 42 °С.

#### Бактериологический контроль эффективности обработки рук персонала

Смывы с рук персонала производят стерильными марлевыми салфетками размером 5 × 5 см, смоченной в нейтрализаторе. Марлевой салфеткой тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук. После отбора проб марлевую салфетку помещают в широкогорлые пробирки или колбы с физиологическим раствором и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 мин. Жидкость засевают глубинным способом на 2 чашки Петри с мясопептонным агаром (по 0,5 мл) и в 2 пробирки с 0,5 %-м сахарным бульоном (по 1 мл). Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч.

#### Учет результатов

Отсутствие роста патогенных и условно патогенных бактерий.

## День 23. Дезинфекция, стерилизация и утилизация материала

Стерилизация – полная инактивация микробов в объектах, подвергающихся обработке. Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. Для тепловой стерилизации применяют, в основном, сухой жар и пар под давлением. Стерилизацию сухим жаром осуществляют в воздушных стерилизаторах («сухожаровые шкафы»), которые представляют собой металлический плотно закрывающийся шкаф, нагреваемый с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 1600С в течение 120 мин. Стерилизуют сухим жаром лабораторную посуду и другие изделия из стекла, инструменты, силиконовую резину. Обработку паром под давлением в паровых стерилизаторах (автоклав) является наиболее универсальным методом стерилизации. Поскольку кроме высокой температуры на микробы оказывает воздействие и пар, споры погибают уже при 1200С. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2атм – 1210С – 15-20 мин. Стерилизуют в автоклаве большую часть предметов: перевязочный материал, белье, питательные среды, растворы, инфекционный материал. В настоящее время применяют еще один метод тепловой стерилизации, предназначенный специально для молока – ультравысокотемпературный (молоко обрабатывают в течение нескольких секунд при 130-1500С).

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

Если отсутствует возможность подвергнуть предмет стерилизации, проводится дезинфекция. Например, нельзя простерилизовать бокс, в котором ведутся работы с заразным материалом, операционный стол, руки хирурга или оптического микроскопы. После дезинфекции нет необходимости защищать продезинфицированный материал от попадания микробов извне.

Правила обращения с утилизацией, разработаны в соответствии с требованиями санитарных правил и норм на основании: «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами СанПиН 2.1.7.2790-10»

Класс А - эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (далее – ТБО): мебель, инвентарь, неисправные приборы и

оборудование, не содержащие токсических элементов; неинфицированная бумага, упаковочный материал.

Класс Б - эпидемиологически опасные отходы: отходы с микроорганизмами III-IV групп патогенности(опасности), упаковка и контейнеры из под проб.

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

Организационная в бактериологическом отделе система сбора, временного хранения и удаления отходов является частью общих утвержденных в организации мер и состоит из следующих этапов: Сбор и хранение внутри подразделения, Обеззараживания/обезвреживания отходов в бактериологическом отделе, Транспортировка и загрузка в специальные контейнеры за пределы лаборатории, Транспортировка за пределы учреждения (на основании договора вывоз отходов), Организации обучения персонала правилам эпидемиологической безопасности при обращении с отходами.

В качестве тары для сбора мусора используют одноразовые пакеты с соответствующей маркировкой (цветовой и текстовой). Пакеты для отходов класса А – белого цвета, для отходов класса Б – желтого цвета. Норматив заполнения пакета не более

$\frac{3}{4}$  объема, максимальная вместимость до 15кг. Для транспортировки используют тележки и закрывающиеся контейнеры.

Контейнеры для сбора каждого вида отходов должны быть однотипны, хорошо различимы от контейнеров для отходов другого типа, снабжены плотно закрывающимися крышками.

Вывоз отходов классов А и Б осуществляется ежедневно согласно договору со специализированным учреждением. Отходы класса Г (отработанные люминесцентные и бактерицидные лампы, термометры) вывозят по мере необходимости транспортом специального учреждения по договору. Отходы класса Б подлежат обеззараживанию в отделе химическим и (или) физическим способами. Для дезинфекции отходов класса Б химическим способом используют дезинфицирующие средства, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации, в концентрациях и времени экспозиции, указанных в соответствующих рекомендациях по их применению. Приготовление дезинфицирующих растворов, маркировка емкостей с дезинфицирующим раствором, соблюдение условий хранения и сроков годности контролируется в отделе ответственным лицом. Дезинфекция отходов класса Б

физическим способом осуществляется водяным насыщенным паром с избыточным давлением (автоклавированием) с соблюдением режимов обеззараживания, указанным в Федеральных санитарно-эпидемиологических правилах «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08» (в ред. Дополнений и изменений № 1 утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 02.06.2009 № 42). После аппаратного обеззараживания с применением насыщенного водяного пара и изменения внешнего вида отходов, отходы класса Б могут временно храниться, транспортироваться и захораниваться с отходами класса А. Упаковка обеззараженных медицинских отходов класса Б должна иметь маркировку, свидетельствующую о проведенном обеззараживании.

## **День 24. Дифференциальный зачёт. Индивидуальное задание**

### **Иммунологические методы идентификации ОКИ**

#### ***Иммуноферментный анализ***

Реакция ИФА основана на специфическом взаимодействии антигена и антител с предварительной иммобилизацией (фиксацией) одного из компонентов реакции (антигена или антител) на твердофазном носителе в лунках полистироловых планшетов, стрипов и выявлении образовавшегося комплекса «антиген-антитело» посредством ферментной метки (конъюгата).

Выявление образовавшегося комплекса осуществляется по измерению интенсивности окраски - оптической плотности (ОП) субстратной смеси, содержащей вещество, с которым реагирует фермент, индикатор, изменяющий цвет под действием продуктов реакции «фермент-субстрат». Определяется ОП с помощью сканирующего спектрофотометра, оснащенного светофильтрами, с определенной длиной волны света: основная - 450 нм, референсная - 620 или 680 нм. Измерение проводится в единицах оптической плотности (ЕОП).

При динамическом наблюдении больного с целью подтверждения диагноза и контроля эффективности лечения следует проводить повторные исследования ИФА, используя метод постановки парных сывороток крови от одного и того же больного, при котором одновременно исследуют два образца сыворотки крови: первый образец, сохраненный после первичного обследования (хранится в замороженном виде), второй образец - взятый в день повторного исследования.

Набор реагентов для ИФА включает: иммуносорбент - твердофазный носитель с адсорбированным на нем активным ингредиентом системы (антигеном, моноклональными или поликлональными антителами); контрольные тест-сыворотки: диагностические, отрицательные, положительные, для контроля хода реакции и оценки результатов анализа; растворы конъюгатов; растворы хромогена и стоп-реагента; разводящие и отмывающие растворы.

#### **Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации**

**Принцип метода** основан на способности обработанных специальными реагентами эритроцитов адсорбировать на своей поверхности антиген и при контакте со специфическими антителами склеиваться и образовывать осадок, видимый невооруженным глазом. РИГА является полуколичественным методом, учет результатов проводится визуально.

Диагностический набор содержит: эритроциты, сенсibilизированные

специфическим антигеном (Д+), обработанные эритроциты без антигена (Д-), положительный контрольный образец (К+), отрицательный контрольный образец (К), реагент для приготовления раствора для разведения сывороток.

**Ход исследования:**

1) реакция непрямой гемагглютинации выполняется строго в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов, и включает следующие этапы:

- подготовка рабочих растворов, необходимых для проведения анализа;
- подготовка испытуемых сывороток и контрольных образцов сывороток;
- внесение в лунки планшета испытуемых и контрольных образцов;
- внесение диагностикума (Д+) и эритроцитов без антигена (Д-);

2) инкубация препаратов в соответствии с условиями в инструкции по применению.

**Оценка результатов реакции.** Результаты исследования учитывают в титрах и по интенсивности реакции, выраженной в крестах. При оценке результатов анализа по 4-крестовой системе учитывается характер осадка на дне лунок:

«++++» - резко интенсивная реакция. Полная агглютинация эритроцитов, которые осели на дно и стенки лунки в виде «зонтика»;

«+++» - интенсивная реакция. Практически полная агглютинация эритроцитов, которые осели на дно и стенки лунки в виде «зонтика», в центре «зонтика» имеется слабо выраженное оседание эритроцитов в виде «точки» или «пуговки»;

«++» - реакция средней интенсивности. Осели в виде «зонтика» 50 % эритроцитов, остальные эритроциты образовали в центре лунки осадок в виде «точки» или «пуговки»;

«+» - реакция слабой интенсивности. Осели в виде «точки» или «пуговки» 75 % эритроцитов - слабо выраженная агглютинация эритроцитов.

Реакция отрицательная: отсутствие агглютинации эритроцитов, осадок сформирован в виде «точки» или «пуговки» с ровными, четкими краями.

Учет проводится при соответствующих показателях контролей:

«Д+» - не образуют спонтанной агглютинации в отсутствии сыворотки;

«сК-» - Д+ не агглютинируют в разведении выше диагностического титра;

«сК+» - Д+ агглютинируют в соответствующем титре (согласно инструкции по прилагаемой к набору реагентов для РИГА);

«Д-» - не образуют спонтанной агглютинации в отсутствии сыворотки, а также с К+ и испытуемыми сыворотками.

Конечным титром реакции испытуемого образца сыворотки считают максимальное

разведение, при котором наблюдается четкая агглютинация не менее чем на 2 или 3 креста в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. Диагностические титры реакции с эритроцитарными диагностикумами указаны в инструкции по применению.

**Лист лабораторных исследований.**

Исследования.																			ИТОГ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ.																			
Изучение культуральных, морфологических св-в																			
Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитической активности																			
Серодиагностика РА																			
РП																			
РСК																			
РИФ																			
РНГА																			
Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты;																			
участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований																			
Санитарная микробиология исследование воздуха																			
Санитарная микробиология исследование смывов с рук и объектов окружающей среды																			



## ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ (ПРЕДДИПЛОМНОЙ) ПРАКТИКЕ

Ф.И.О. обучающегося  
Тамониной Ольги Вячеславовны

группы \_\_407\_\_ специальности Лабораторная диагностика

Проходившего (ей) преддипломную практику  
с 12.05 по 08.06 2020 г.

За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

### 1. Цифровой отчет

№	Виды работ	Количество
1.	- изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ:	
2.	- прием, маркировка, регистрация биоматериала.	
3.	Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ.	
4.	Изучение культуральных, морфологических свойств исследуемой культуры.	
5	Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитической активности исследуемой культуры.	
6	Серодиагностика РА	
7	РП	
8	РСК	
9	РИФ	
10	РНГА	
11	Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты;	
12	участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований	
13	Санитарная микробиология исследование воздуха	
14	Санитарная микробиология исследование смывов с рук и объектов окружающей среды	

## 2. ТЕКСТОВОЙ ОТЧЕТ

### 1. Умения, которыми хорошо овладел в ходе практики:

Приготовление питательных сред, изучение культуральных и морфологических свойств исследуемой культуры. Изучение сахаралитических, протеолитических, гемолитических активностей исследуемой культуры. Серодиагностика РА, РП, РСК, РИФ, РНГА.

Утилизация отработанного материала, дезинфекция, стерилизация

### 2. Самостоятельная работа:

Варка питательных сред, постановка реакций РНГА, РА,

Прием, маркировка, регистрация биоматериала

Иммунологические методы идентификации ОКИ

### 3. Помощь оказана со стороны методических и непосредственных руководителей:

Помощь методического руководителя по оформлению дневника

### 4. Замечания и предложения по прохождению практики:

нет

Общий руководитель практики Жукова М. В. Жукова М. В.  
(подпись) (ФИО)

**ХАРАКТЕРИСТИКА**  
**Тамонина Ольга Вячеславовна**  
*ФИО*

обучающийся (ая) на 4 курсе по специальности СПО

**31.02.03**      **Лабораторная диагностика**

успешно прошел (ла) преддипломную практику по разделу:

«Теория и практика лабораторных микробиологических и иммунологических исследований»

в объеме 144 часов с «12» мая 2020г. по «08 » июня 2020г.

в организации ДО

---

*наименование организации, юридический адрес*

За время прохождения практики:

<b>№ ОК/ПК</b>	<b>Критерии оценки</b>	<b>Оценка (да/нет)</b>
ПК 3.1, ОК13	Быстро и правильно готовит рабочее место в соответствии с методикой.	
ПК3.2 ОК 2	Соблюдает методику при выполнении исследований. Правильно интерпретирует результаты исследований.	
ПК 3.3	Соблюдает форму заполнения учетно-отчетной документации (журнал, бланки).	
ПК 3.4, ОК 11	Проводит мероприятия по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты. Утилизирует отработанный материал в соответствии с инструкциями и СанПин.	
ОК 1	Демонстрирует интерес к профессии. Внешний вид опрятный, аккуратный.	
ОК 6	Относится к медицинскому персоналу и пациентам уважительно, отзывчиво, внимательно. Отношение к окружающим бесконфликтное.	
ОК 7	Проявляет самостоятельность в работе, целеустремленность, организаторские способности.	

ОК 9	Способен освоить новое оборудование или методику (при ее замене).	
ОК 10	Демонстрирует толерантное отношение к представителям иных культур, народов, религий.	
ОК 12	Способен оказать первую медицинскую помощь при неотложных ситуациях	
ОК14	Соблюдает санитарно-гигиенический режим, правила ОТ и противопожарной безопасности. Отсутствие вредных привычек. Участвует в мероприятиях по профилактике профессиональных заболеваний	

«08» июня 2020 г.

Подпись непосредственного руководителя практики

\_\_\_\_\_ /ФИО, должность

Подпись общего руководителя практики

*Жукова М.В.* /ФИО, должность