

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»

Видяйкина Евгения Николаевна  
ФИО

---

Место прохождения практики:

с « 12 » мая 20 20 г. по « 08 » июня 20 20 г.

Руководители практики:

Методический – Жукова М. В. преподаватель

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 , сахаролитических, гемолитических свойств микроорганизмов, антигенной структуры.

## Тематический план

| №                            | Наименование разделов и тем практики  | Всего часов              |
|------------------------------|---|--------------------------|
|                              | Проведение лабораторных микробиологических исследований   | 144                      |
| 1                            | Ознакомление с правилами работы в бак лаборатории   | 6                        |
| 2                            | Подготовка материала к микробиологическому исследованиям: прием<br>, 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                        |
| 10                           | Дифференцированный зачет  | 6                        |
| Вид промежуточной аттестации |   | Дифференцированный зачет |

График прохождения практики.

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

# День 1

## Ознакомление с правилами работы в бактериологической лаборатории

### Устройство бактериологической лаборатории.

Бактериологическая лаборатория при КГБУЗ «Красноярская клиническая больница №1» выполняет анализы, необходимые для постановки и уточнения диагноза инфекционного заболевания, что помогает правильно выбрать специфическое лечение и определить сроки выписки больного из стационара, располагается в отдельно стоящем здании, обеспечена водопроводом, канализацией, электричеством, отоплением и вентиляцией. Все помещения лаборатории полностью соответствуют СП 1.2.731-99

Помещения лаборатории разделены на "заразную" и "чистую" зоны.

В "*чистой*" зоне располагаются: гардероб для верхней одежды; комната для переодевания; комната отдыха и приема пищи; помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, моечная, приготовление и розлив питательных сред и др.); стерилизационная; помещение с холодильной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов; комната для работы с документацией и литературой; кабинет заведующего; подсобные помещения; туалет.

В "*заразной*" зоне: помещение для приема и регистрации материала; боксированные помещения или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности; комнаты для проведения исследований и посевов; термостатная комната; автоклавная для обеззараживания.

Согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней»:

1. Работу с ПБА III-IV групп могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием.
2. При приеме на работу, связанную с использованием ПБА III-IV групп, персонал должен проходить предварительный медицинский осмотр.
3. Все сотрудники бактериологической лаборатории, привлекаемые к работам с ПБА III-IV групп, должны проходить периодические медицинские осмотры, в соответствии с нормативными документами.
4. У сотрудников лабораторий, проходящих ПЦР исследование исследования на гепатиты В и С, ежегодно проводятся контрольные исследования на наличие соответствующих антигенов (антител) в сыворотке крови.
5. Сотрудники, работающие с кровью (сывороткой, плазмой крови), должны быть иммунизированы против вирусных гепатитов.

6. В случае появления у сотрудника симптомов, характерных для инфекционного заболевания, сотрудник должен ставить об этом в известность заведующего бактериологической лабораторией.

7. Все жидкие отходы, образующиеся в процессе работы в «заразной» зоне, подлежат обязательному химическому или термическому обеззараживанию.

### **Требования к проведению работ в лаборатории**

1. Доставка в лабораторию материала осуществляется в контейнерах, биксах или в сумках-холодильниках.

2. Прием и разработка доставляемого материала (проб) на все виды исследований должна проводиться с соблюдением мер предосторожности.

3. Первичная обработка материала на ПЦР исследования должна проводиться только в комнате приема БМ.

4. При пипетировании необходимо пользоваться только резиновыми грушами или автоматическими устройствами.

5. Бактериологическая петля должна быть замкнута в непрерывное кольцо и иметь плечо длиной не более 6 см.

6. Хранение ПБА, их учет, передача, транспортирование и уничтожение проводится в соответствии с требованиями действующих нормативных документов.

7. Использование материалов и средств личной гигиены, раздражающих кожу, не допускается.

8. Прием посетителей, хранение пищевых продуктов, прием пищи разрешается только в специально отведенных местах в «чистой» зоне.

9. В «заразной» зоне не допускается:

- пипетировать ртом, переливать жидкий инфекционный материал через край сосуда;

- хранить верхнюю одежду, обувь, зонты, косметику и т.п., а также продукты питания;

- курить, пить воду;

- оставлять рабочее место во время работы с ПБА;

- сливать жидкие отходы без предварительного обеззараживания.

Требования к порядку использования рабочей одежды и средств индивидуальной защиты (СИЗ)

1. Сотрудники лабораторий должны быть обеспечены рабочей одеждой.

2. Рабочая одежда и обувь должны быть индивидуальными.

3. При работе в боксированных помещениях производится смена медицинского халата на противочумный или хирургический.

4. Перемещение одежды из зоны в зону, категорически не допускается.

5. Смена рабочей одежды должна проводиться по мере загрязнения, но не реже одного раза в неделю.

6. Перед сдачей в стирку защитная одежда должна быть обеззаражена.

**День 2**  
**Подготовка материала к микробиологическому исследованиям:**  
**прием , регистрация биоматериала**

**Прием биоматериала.**

В лаборатории прием исследуемого биоматериала проводится в утренние часы. В бактериологической лаборатории исследуемым материалом являются: испражнения (моча, кал), промывные воды бронхов, раневое содержимое, отделяемое из зева или носа и др. Весь поступающий биоматериал сопровождается направлением, в котором указывается ФИО пациента, возраст, пол, отделение из которого доставлен биоматериал и возможный диагноз. На направлении так же есть номер или штрих-код, который вводится при регистрации поступления в базу qMS.



Прием материала должен осуществлять ответственный сотрудник лаборатории, назначенный заведующим лабораторией или лицом, его замещающим, под подпись с указанием даты и времени доставки.

Порядок доставки и приема также должен быть согласован между отделением ЛПУ и лабораторией, что должно быть оформлено документально.

Прием материала в лаборатории осуществляют непосредственно после его доставки. Сотрудник, отвечающий за этот этап работ, должен проверить соответствие представленного материала записи о нем в сопровождающем документе.

**Лаборатория может отказаться от приема материала в том случае, если:**

- отсутствует или не оформлена надлежащим образом сопровождающая документация; - не маркирован материал;
- констатируется нарушение сохранности (целостности, герметичности) упаковки;
- очевидно нарушение условий сбора, хранения и/или транспортирования.

Отказ в приеме материала с указанием причины фиксируют в отдельном журнале<sup>1)</sup> и заверяют подписями представителей обеих сторон

## Регистрация биоматериала

Весь поступающий биоматериал регистрируется в ЛИМС «qMS» и в бумажном журнале регистрации материала, а затем разбирается по рабочим местам, для дальнейшей регистрации в соответствующих журналах учета и журналах регистрации биоматериала.

**Журнал регистрации материала, поступающего в бактериологическую лабораторию, и проведенных исследований должен содержать следующие обязательные поля:**

- дата поступления материала;
- номер исследования;
- отделение (учреждение), приславшее материал;
- № истории болезни или Ю;
- ФИО больного (полностью);
- пол;
- дата рождения;
- диагноз (при направлении на исследование), код по МКБ-10;
- важнейшие клинические данные;
- откуда получен материал;
- характер материала;
- дата взятия биологического материала;
- ФИО врача, направившего материал;
- дата проведения исследования;
- результат исследования;
- ФИО врача, проводившего исследование.

Журнал должен быть прошнурован, пронумерован и скреплен печатью.

Форма журнала может быть свободной, но с указанием всех параметров исследования и с наличием всех граф, имеющих в направлении.

### Дни 3-4

## Приготовление питательных сред общепотребительных, элективных, дифференциально-диагностических для выделения возбудителей гнойно-воспалительных, кишечных и нозокомиальных инфекций. (сюда добавить материала)

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

### Классификации питательных сред:

| 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   |
| По консистенции   |   |   |
| 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  |
| По составу  |   |   |
| Простые среды   |   | Сложные среды   |
| МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера  |   | Кровяной агар   |
| По назначению   |   |   |
| Вид среды   | Назначение  | Пример  |
| Основные  | Культивирование большинства микробов  | МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера  |
| Специальные   | Выделение и выращивание бактерий, не растущих на простых средах                     | Среды с добавлением сахара (стрептококк), сыворотки крови (пневмо- и менингококк)   |
| Элективные  | Выделение определенного вида (способствуют его росту и подавляют рост других видов) | Среды с теллуридом калия (коринебактерии и стафилококк), висмут-сульфитный агар (сальмонеллы), среда Плоскирева (сальмонеллы и шигеллы) |
| Дифференциально-диагностическая   | Дифференцирование одного вида от другого по ферментативной активности               | Среды Гисса, среда Эндо, среда Левина, агар Симмонса, ацетатный агар, агар Клиглера, среда Преуса                                       |

|                    |  |  |
|--------------------|--|--|
| ие                 |  | (с мочевиной), среды с аминокислотами (лизин, аргинин, фенилаланин, орнитин) |
| Консервирую<br>щие | Первичный посев и<br>транспортировка материала | Глицериновая смесь   |

### Этапы приготовления сред:

- 1) варка,
- 2) установление оптимальной величины рН,
- 3) фильтрация,
- 4) разлив,
- 5) стерилизация,
- 6) контроль.

Все среды приготавливают согласно инструкции, указанной на упаковке. 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. 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.

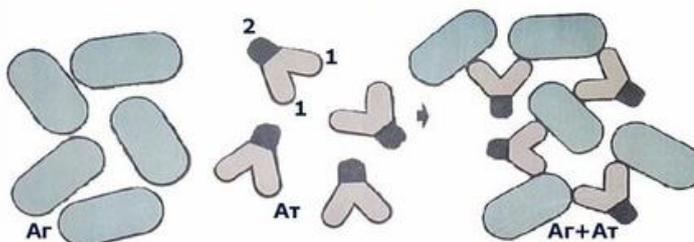
**День 5 – 6**  
**Иммунодиагностика : РА, РП, РСК, РИФ, ПЦР**

**РА - Реакция Агглютинации.**

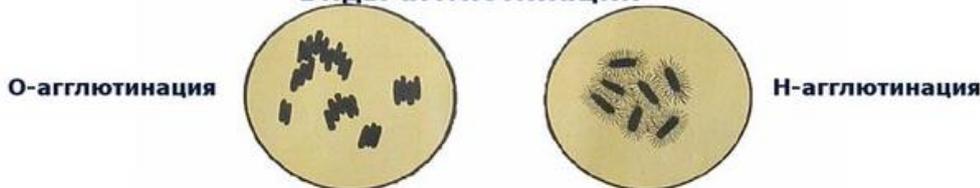
Склеивание и выпадение в осадок микробных или других клеток (эритроцитов) под действием антител в присутствии электролита. Видимый эффект реакции (феномен агглютинации) – образование осадка, который называется агглютинатом.

**Реакция агглютинации**

**механизм реакции**



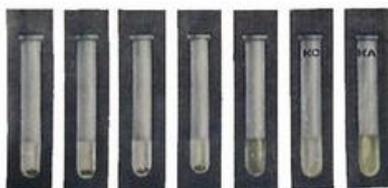
**Виды агглютинации**



**Способы постановки**



**Развёрнутая реакция**



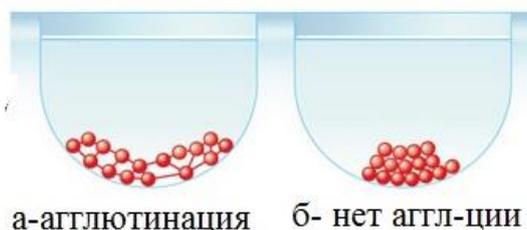
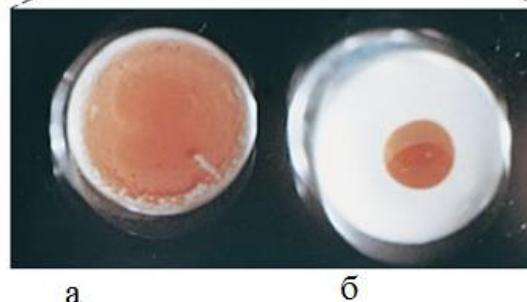
Аг – антиген  
Ат – антитело (1-FAВ-фрагмент, 2-Fc-фрагмент)  
Аг+Ат – комплекс антиген+антитело  
КА – контроль антигена  
КС – контроль сыворотки

РА используют для серодиагностики (обнаружение антител в сыворотке крови больных) брюшного тифа и паратифа (реакция Видаля), бруцеллеза (реакция Райта), туляремии и лептоспироза. РА используют для сероидентификации (определения вида возбудителя, выделенного от больного) при кишечных инфекциях, коклюше, холере и др.

Способы постановки РА:

1. Ориентировочная (пластинчатая) РА – проводится на стекле. На предметное стекло наносят 2 капли сыворотки и 1 каплю изотонического раствора. В одну из капель сыворотки и в каплю изотонического раствора петлей вносят микробную культуру и перемешивают. Капля изотонического раствора с микробами – *контроль антигена*, капля сыворотки без микробов – *контроль антитела*, капля сыворотки с микробами – *опыт*. Если в сыворотке имеются антитела, соответствующие микробным антигенам,

которые с ней смешиваются, то антитела и антигены будут специфически связываться друг с другом и через 1 – 3 мин в опытной капле появятся хлопья агглютината. Контроль антигена должен быть мутным, а контроль антитела – прозрачным. Учет результатов реакции проводится по появлению хлопьев агглютината. Если выпадают хлопья – реакция положительна, т.е. антиген соответствует антителу и по антигену можно определить антитело или наоборот. Если остается помутнение – реакция отрицательная.



2. Развернутая реакция агглютинации – проводится в пробирках. Вначале готовят 2-хкратные разведения сыво ротки крови больного человека от 1:50 до 1:1600. В 6 пробирок наливают по 1 мл

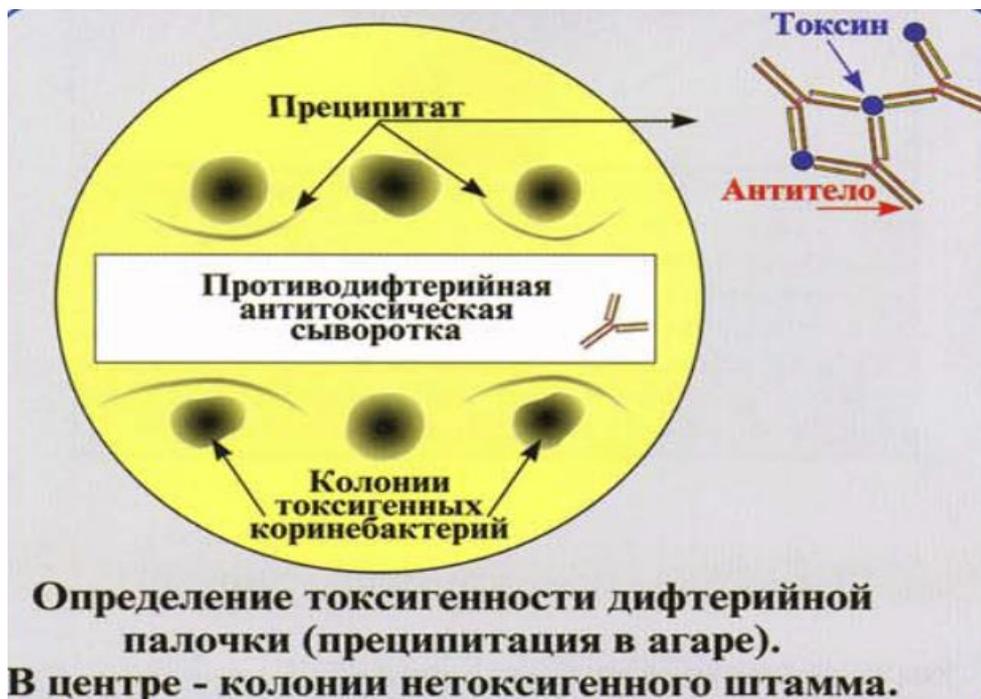
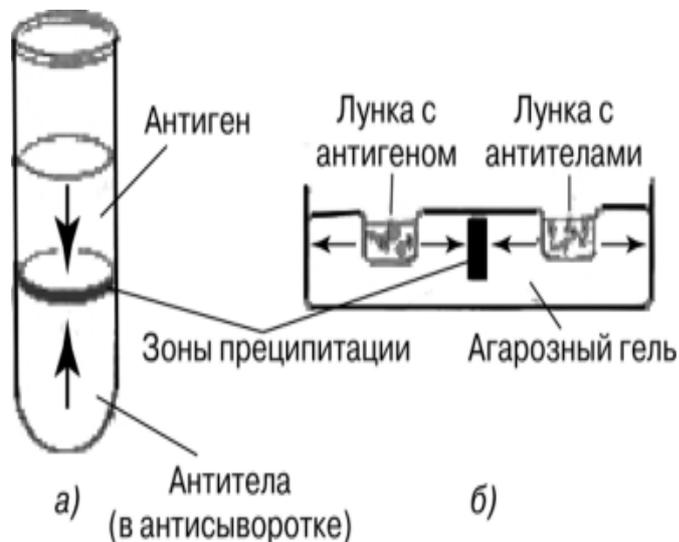
изотонического раствора хлорида натрия. В первую пробирку вносят 1 мл сыворотки крови больного в разведении 1:50, перемешивают и получают разведение 1:100, затем 1 мл разведения 1:100 переносят во вторую пробирку и получают разведение 1:200 и т.д. Две пробирки оставляют для контроля антигена и сыворотки. В контроль сыворотки добавляют только сыворотку в разведении 1:50, в контроль антигена – только антиген. Во все остальные пробирки добавляют 0,1 мл антигена - диагностикума и ставят все пробирки в термостат при 37°C на 18-20 часов. Учет результатов реакции проводят по характеру, количеству образовавшегося осадка (агглютината) и степени мутности. Учет проводят только при следующих результатах в контролях: контроль сыворотки – прозрачный, контроль антигена – мутный. О-антитела дают мелкозернистый осадок. Н-антитела – крупнозернистый. По последней пробирке, в которой еще видна реакция агглютинации, устанавливают диагностический титр.

При серодиагностике заболеваний важно не просто обнаружить специфические антитела к определенному возбудителю, но и выявить их количество, т.е. установить такой титр антител, когда можно говорить о наличии заболевания, вызванного этим возбудителем. Этот титр и называется диагностическим титром. Например, для диагностики брюшного тифа нужно выявить титр антител – 1:400, но не меньше. Еще более точные результаты дает выявление нарастания антител в парных сыворотках. Сыворотку больного отбирают в начале заболевания и через 3 – 5 или более дней. Если титр антител возрастает не менее, чем в 4 раза, следовательно, можно говорить о текущем заболевании.

Если развернутая реакция агглютинации ставится для сероидентификации, то используют агглютинирующие диагностические сыворотки, разведенные до титра или до половины их титра. РА считается положительной, если агглютинация обнаруживается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки.

## РП - Реакция Преципитации

Формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах; избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.



РП ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. Широкое распространение получили разновидности РП в полужидком геле агара или агарозы: двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.

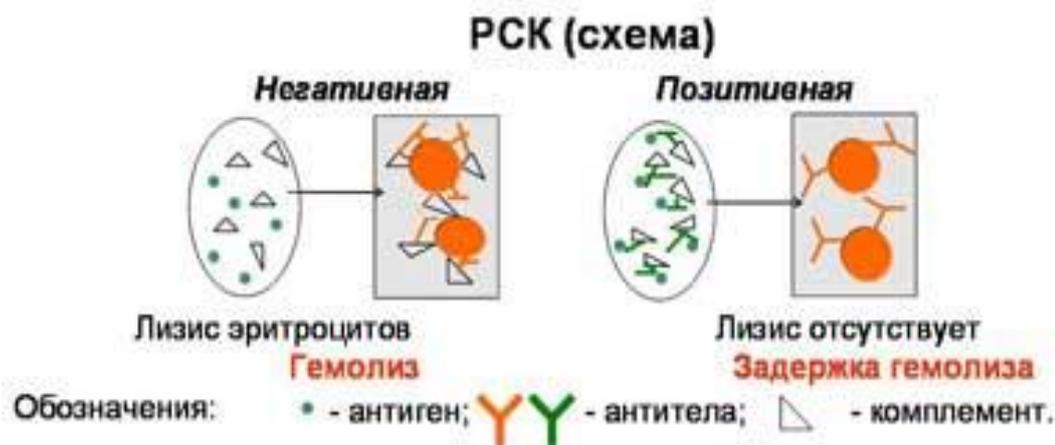
Проводится с прозрачными коллоидными растворимыми антигенами, экстрагированными из патологического материала, объектов внешней среды

или чистых культур бактерий. В реакции используют прозрачные диагностические преципитирующие сыворотки с высокими титрами антител. За титр преципитирующей сыворотки принимают то наибольшее разведение антигена, которое при взаимодействии с иммунной сывороткой вызывает образование видимого преципитата — помутнение.

Реакция кольцепреципитации ставится в узких пробирках (диаметр 0,5 см), в которые вносят по 0,2—0,3 мл преципитирующей сыворотки. Затем пастеровской пипеткой медленно настилают 0,1—0,2 мл раствора антигена. Пробирки осторожно переводят в вертикальное положение. Учет реакции производят через 1—2 мин. В случае положительной реакции на границе между сывороткой и исследуемым антигеном появляется преципитат в виде белого кольца. В контрольных пробирках преципитат не образуется.

### РСК - Реакция связывания комплемента

Принцип реакции: при соответствии друг другу антигена и антитела образуется 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.

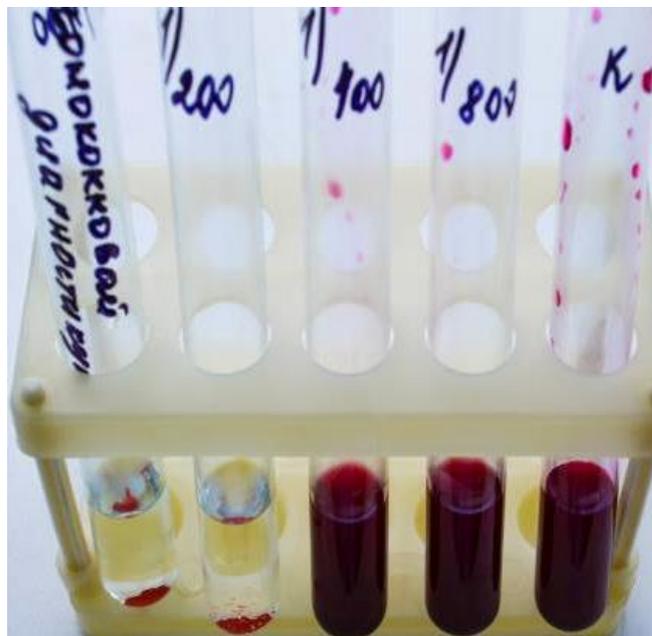


Специфическое взаимодействие АГ и АТ сопровождается адсорбцией (связыванием) комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент.

Комплексом АГ-АТ. Если АГ и АТ соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если АТ не соответствует АГ, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз.

Относится к сложным серологическим реакциям. Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система).

РСК проводят в две фазы: 1-я 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 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).

## РИФ - Реакция Имунофлюоресценции

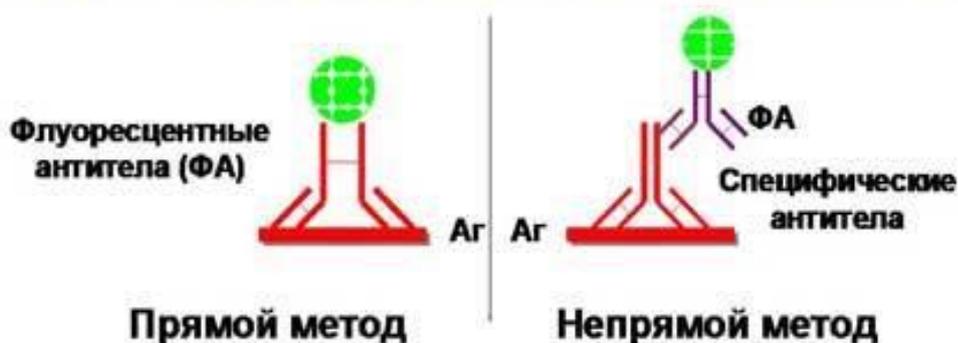
Иммунофлюоресцентный метод (РИФ, реакция Кунса) - метод выявления специфических АГ с помощью АТ, конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения АТ и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов и др. клеток.



Обнаружение бактериальных и вирусных антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток) получило широкое применение в диагностической практике. Приготовление флюоресцирующих сывороток основано на способности некоторых флюорохромов вступать в химическую связь с сывороточными белками, не нарушая их иммунологической специфичности.

Различают три разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом. 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.

### Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)

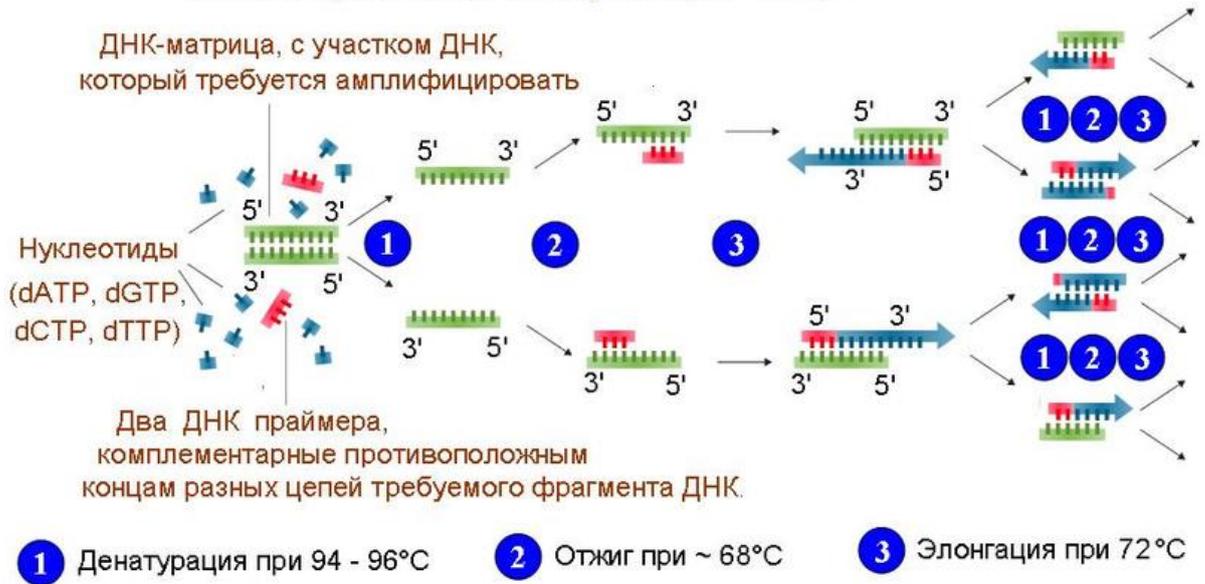


Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой сывороткой, меченной флюорохромом. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

### ПЦР - Полимеразная Цепная Реакция.

Метод ПЦР использует принципы молекулярной биологии. Его суть заключается в применении особых ферментов, которые многократно копируют фрагменты РНК и ДНК возбудителей болезни, которые находятся в пробах биоматериала, например в крови.

## Полимеразная цепная реакция - ПЦР



Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи фермента Taq- ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция позволяет получить амплификаты длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов. Для увеличения длины ПЦР-продукта до 20-40 тыс. пар нуклеотидов применяют смесь различных полимераз, но все равно это значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки.

Диагностические возможности метода ПЦР огромны, с его помощью можно выявить самые разные инфекции. Чаще всего ПЦР-метод применяют для диагностики: ВИЧ, герпеса, различных половых инфекций, в частности хламидиоза, уреаплазмоза, гарднереллеза, микоплазмоза и трихомониаза, кандидоза, гепатитов, туберкулеза, ВПЧ и др. Это далеко не полный список, метод ПЦР-анализа используется в разных областях медицины.

### Дни 7 - 12

#### Микробиологическая диагностика возбудителей кишечных инфекционных заболеваний

Одной из основных групп возбудителей кишечных инфекционных заболеваний, которую исследуют в лаборатории, является семейство энтеробактерий - *Enterobacteriaceae*. Его представители и вызывают острые кишечные инфекции.

В настоящее время все клинически значимые кишечные



бактерии делят на 12 родов, из которых будут рассмотрены следующие: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Yersinia*.

Считают, что родоначальником всей этой группы микроорганизмов является *кишечная палочка*. В процессе эволюции разновидности кишечной палочки приспособились к паразитическому способу существования, приобрели патогенные свойства и являются в настоящее время возбудителями многих болезней человека и животных.

К *патогенным* представителям семейства кишечных бактерий относятся возбудители брюшного тифа, паратифов А и В, токсикоинфекций, дизентерии.

Многие кишечные бактерии постоянно обитают в кишечнике. При изменении условий существования, например, ослабление организма хозяина, они становятся возбудителями заболеваний. Это так называемые *условно-патогенные бактерии*.

**Пол морфологии** Все кишечные бактерии грамотрицательные палочки. Они являются факультативными анаэробами. Хорошо растут на простых питательных средах.

Энтеробактерий отличаются ферментативной активностью, которая наиболее выражена у сапрофитов и уменьшается по мере усиления патогенности. Эту закономерность можно объяснить тем, что микроорганизмы, приспособляясь к паразитическому образу жизни, утратили ставшие ненужными ферменты.

### **Род Эшерихии – *Escherichia***

Этот род представлен только одним видом бактерий - *E. coli*, но объединяет множество вариантов. Разновидности кишечной палочки отличаются по биологическим свойствам, у них могут быть разные наборы ферментов (биовары) и разная антигенная структура (серовары).

**Морфология.** *E. coli* - короткие, в среднем  $0,5-3,0 \times 0,5-0,8$  мкм палочки. Грамотрицательны. В большинстве случаев они подвижны, перитрихи. Однако некоторые варианты кишечной палочки неподвижны. Многие штаммы образуют капсулу. Спор не образуют.

**Культивирование.** Кишечная палочка - факультативный анаэроб. Хорошо растет на простых питательных средах при  $37^{\circ}\text{C}$  и рН среды 7,2-7,8, и при  $43-45^{\circ}\text{C}$ , а кишечные палочки холоднокровных при этих условиях не размножаются. Это различие в свойствах *E. coli* разного происхождения используют для определения санитарного состояния объекта, так как только обнаружение *E. coli* теплокровных свидетельствует о санитарном неблагополучии.

На МПА кишечная палочка образует мутноватые, слегка выпуклые влажные колонии с ровным краем. На МПБ дает равномерное помутнение. Культуры, имеющие капсулу, растут в виде слизистых колоний.

Для идентификации эшерихий используют дифференциально-диагностические среды: Эндо и агар с эозинметиленовым синим (ЭМС). На среде Эндо кишечная палочка растет в виде малиново-красных колоний с металлическим блеском или без него. На среде ЭМС - в виде темно-фиолетовых колоний.

### Ферментативные свойства.

| Вид бактерий | Тест     |          |          |        |          |       |                  |              |
|--------------|----------|----------|----------|--------|----------|-------|------------------|--------------|
|              | лак-тоза | глю-коза | сахароза | маннит | мальтоза | индол | H <sub>2</sub> S | молоко       |
| E.coli       | кг       | кг       | кг       | кг     | кг       | +     | —                | Створаживает |

## Микробиологическое исследование

### Материал для исследования

1. Испражнения.
2. Рвотные массы.

При необходимости исследует отделяемое из носа и зева, гной из уха, кровь, мочу, кусочки органов трупа.

При возникновении очага заболеваний коли-энтеритом исследуют (по эпидемиологическим показаниям) пищевые продукты, смывы с рук обслуживающего персонала, игрушек и других предметов.

### Способы сбора материала

**Испражнения** 3—5 г испражнений помещают в пробирку с изотоническим раствором натрия хлорида или 30% глицериновой смесью (30 частей глицерина и 70 частей изотонического раствора натрия хлорида). Целесообразно брать последние порции кала, так как при коли-энтеритах поражается тонкий кишечник. У грудных детей материал для исследования берут с пеленок

**Рвотные массы** 3—5 г собирают в стерильную посуду и эмульгируют (размешивают) в изотоническом растворе натрия хлорида

Примечание. Чем раньше от начала заболевания исследуют испражнения, тем вероятнее возможность выделения возбудителя.

### Основной метод исследования - Бактериологический

## Ход исследования

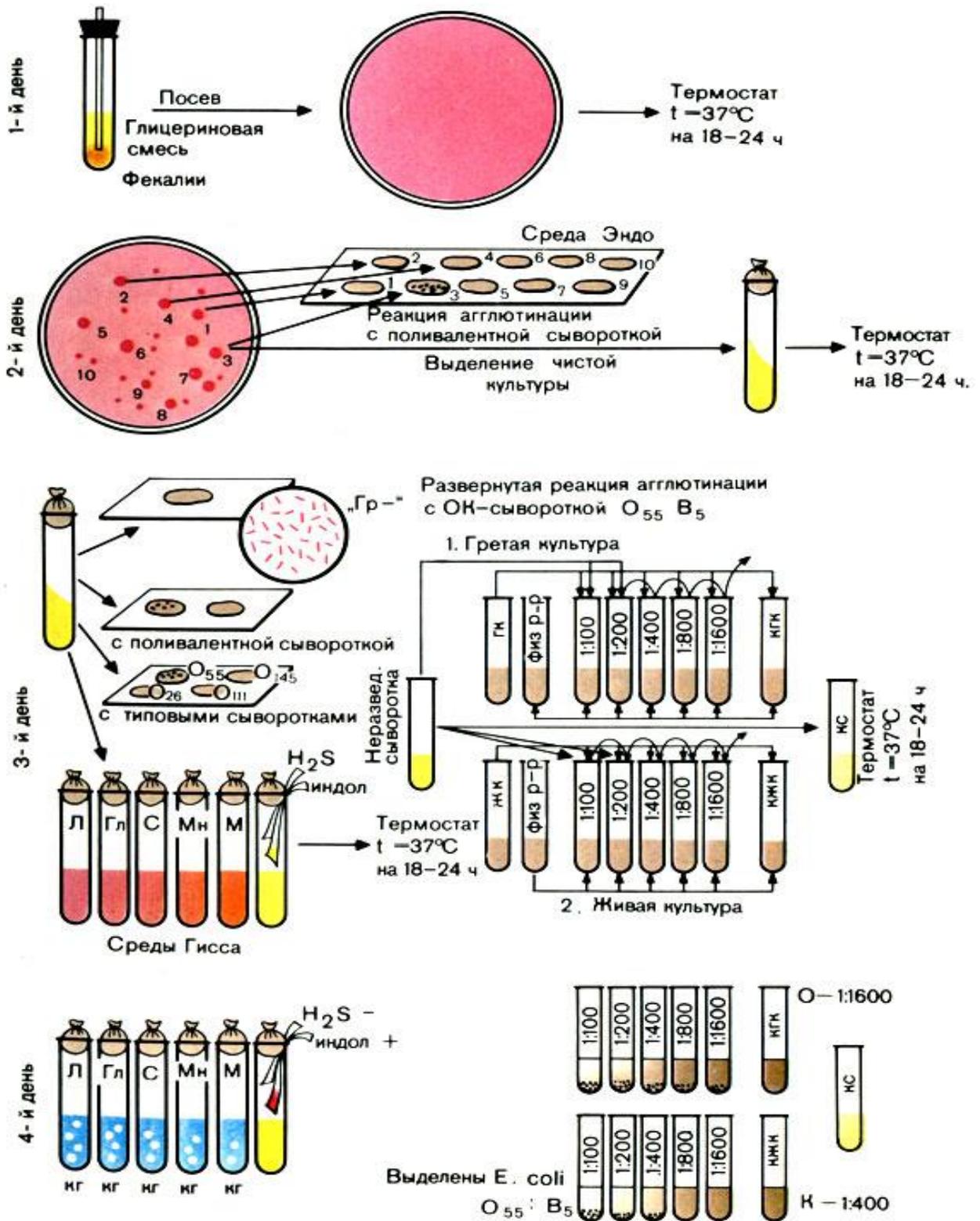


Таблица 1 - Результаты реакции агглютинации с культурами эшерихий

| Культура | Разведения сыворотки |       |       |        |        | Результат     |
|----------|----------------------|-------|-------|--------|--------|---------------|
|          | 1:100                | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 |               |
| Живая    | ++++                 | ++++  | +     | -      | -      | Положительный |
| Гретая   | ++++                 | ++++  | ++++  | +++    | ++     |               |
| Живая    | ++++                 | ++++  | +++   | ++     | -      | Сомнительный  |
| Гретая   | ++++                 | ++++  | +++   | ++     | +      |               |
| Живая    | ++++                 | ++++  | +++   | ++     | -      | Отрицательный |
| Гретая   | ++++                 | ++    | -     | -      | -      |               |

### Род Шигеллы –Shigella, Возбудители дизентерии

**Морфология.** это небольшие - 2-3 мкм палочки с закругленными концами. Отличаются от остальных представителей семейства Enterobacteriaceae отсутствием жгутиков. Они не имеют спор и капсул. Грамотрицательны.



**Культивирование.** Шигеллы - факультативные анаэробы.

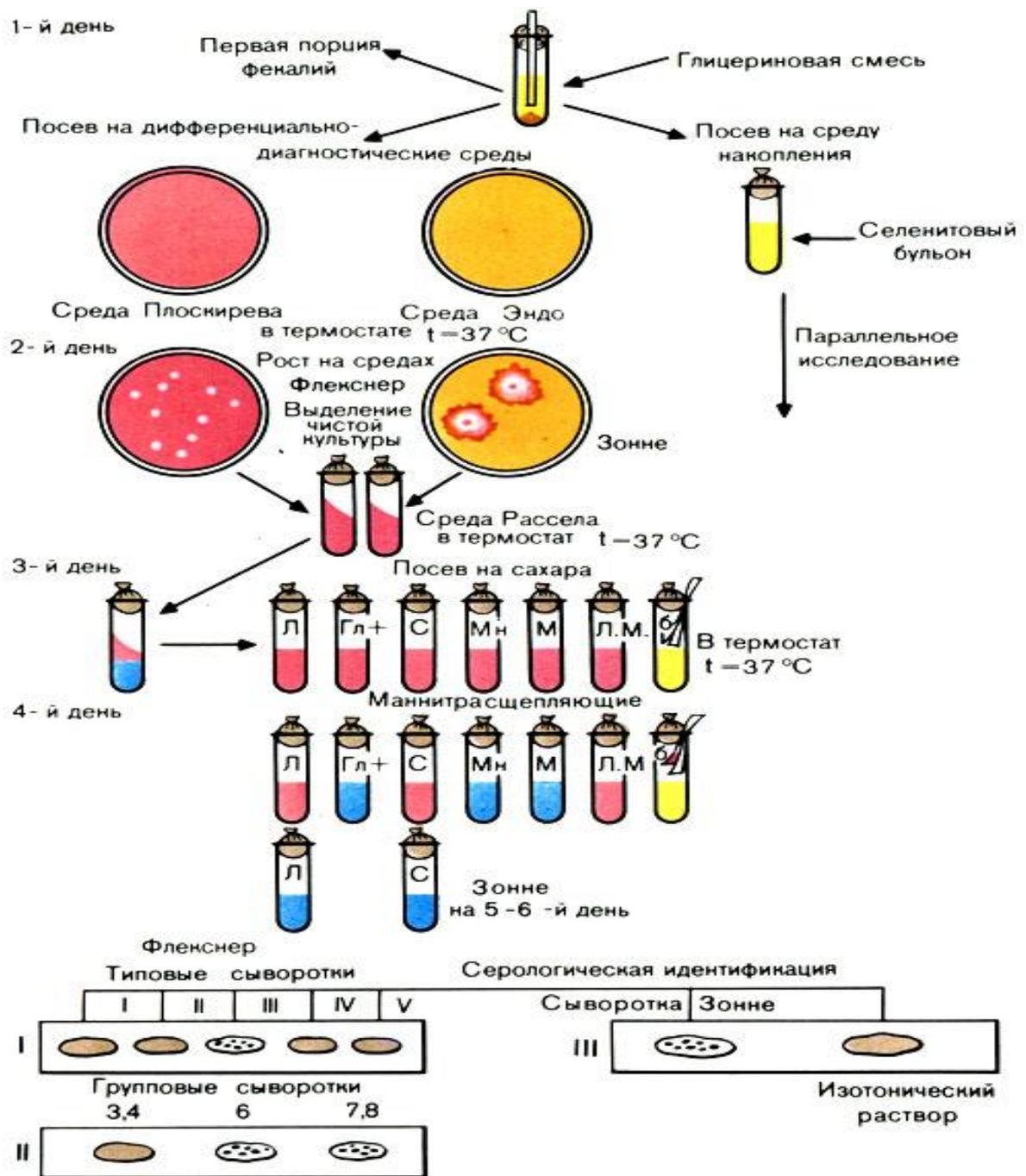
Неприхотливы к питательным средам. Размножаются на МПА и МПБ при температуре 37° С и рН 7,2-7,4. Элективными и дифференциально-диагностическими средами для них являются среды Плоскирева, Эндо, ЭМС. Растут в виде небольших, полупрозрачных, сероватых, круглых колоний, размером 15-2 мм в S-форме. Исключением являются шигеллы Зонне, которые часто диссоциируют, образуя крупные, плоские, мутные, с изрезанными краями колонии R-формы (рис. 44). В жидких питательных средах шигеллы дают равномерную муть, R-формы образуют осадок.

Исследование ведется по классической схеме бактериологического метода. Исследуемый материал – испражнения.

На 4й день производится идентификация возбудителя, доведенного до вида.

Таблица 2 - 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      | -       | -     | -           |
| Д - Зоне            | К       | К       | К        | К      | К        | К      | -       | -     | -           |



### Серологическая идентификация

Вид, серовар, подсеровар выделенной культуры устанавливают при помощи адсорбированных сывороток. Анализ антигенной структуры начинают с реакции агглютинации на стекле со смесью № 1. В эту смесь входят сыворотки с антителами к шигеллам Зонне, Ньюкасл и поливалентная сыворотка к шигеллам Флекснера. При положительной реакции агглютинации со смесью выделенную культуру агглютинируют отдельно с каждой сывороткой, входящей в смесь.

Положительная реакция агглютинации с адсорбированной сывороткой к шигеллам Зонне и Ньюкасл дает право дать ответ. Для установления серовара и подсеровара шигелл Флекснера необходимо дополнительно

поставить реакции агглютинации с типовыми (I, II, III, IV, V) и групповыми (1-3, 4-6-7, 8) сыворотками. Например, выделенная культура дала положительную реакцию с типовой сывороткой II и групповой сывороткой 3, 4. Как видно из таблицы, выделена культура шигелл Флекснера, серовар 2, подсеровар 1а. Ответ: выделены шигеллы Флекснера 2а.

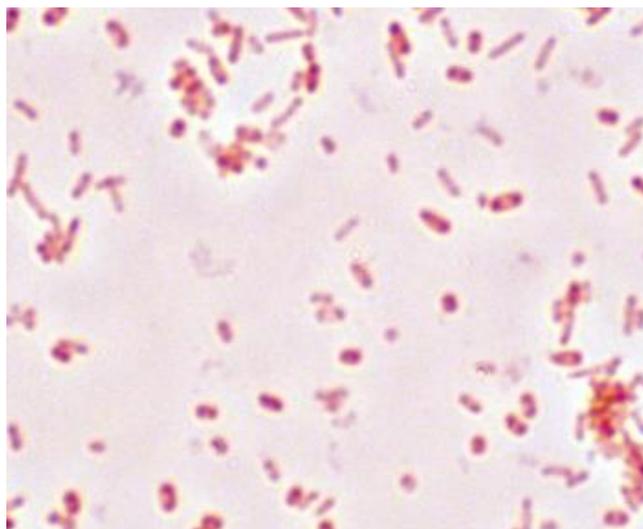
В качестве ускоренных методов микробиологического исследования при дизентерии применяют люминесцентную микроскопию и биологическую пробу на морских свинках. При введении вирулентных штаммов шигелл в конъюнктивальный мешок (под нижнее веко) к концу 1-х суток у животных развивается конъюнктивит.

При микробиологическом исследовании в ответах указывают серовариант и подсеровариант выделенной культуры. Например, выделена культура шигелл Флекснер 1а.

### Род Сальмонеллы -*Salmonella*.

К этому роду семейства энтеробактерий относится более 2000 различных бактерий, вызывающих заболевания - *сальмонеллезы*. Сальмонеллы сходны по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам, но отличаются по антигенной структуре.

Сальмонеллы делят на монопатогенные и полипатогенные. К первым относятся возбудители брюшного тифа, паратифа А и паратифа В, последние поражают человека и животных.



**Морфология.** Все сальмонеллы мелкие,  $1,0-3,0 \times 0,6-0,8$  мкм палочки с закругленными концами. Грамотрицательны. Подвижны, перитрихи. Спор и капсул не образуют.

**Культивирование.** Сальмонеллы - факультативные анаэробы. Они не требовательны к питательным средам. Хорошо растут на МПА и МПБ при  $37^\circ \text{C}$  (от  $20$  до  $40^\circ \text{C}$ ) и рН среды  $7,2-7,4$  (от  $5,0$  до  $8,0$ ). На МПА образуют нежные, полупрозрачные, слегка выпуклые, блестящие колонии, в МПБ - равномерное помутнение. Среды обогащения: селенитовый бульон, среду Мюллера, среду Кауфмана. Используют также элективные (избирательные) среды: желчь (10-20%) и среду Раппопорт.

На дифференциально-диагностических средах Эндо, ЭМС, Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний, так как не расщепляют

лактозу, входящую в состав среды. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч они образуют колонии черного цвета, оставляющие след после того, как их снимают петлей (кроме сальмонелл паратифа А).

У свежевыделенных культур *S. paratyphi* В после инкубации в термостате в течение 18-20 ч и выдерживания при комнатной температуре в течение 1-2 сут на периферии колонии образуется слизистый вал.

Таблица 3 - Ферментативные свойства

| Вид        | Тест    |         |          |        |          |       |             |                   |         |
|------------|---------|---------|----------|--------|----------|-------|-------------|-------------------|---------|
|            | Лактоза | Глюкоза | Сахароза | Маннит | Мальтоза | Индол | Сероводород | Лакмусовое молоко | Желатин |
| Salmonella | -       | К       | -        | К      | К        | -     | +           | К                 | -       |

### Микробиологическое исследование

#### Материал для исследования

В зависимости от стадии болезни исследуют разный материал: кровь, испражнения, моча, дуоденальное содержимое, рвотные массы.

#### Способы сбора материала

**Кровь:**— стерильным шприцом/вакутейнером из локтевой вены и засевают у постели больного во флаконы с селективными средами

**Испражнения:** 3 – 5 г испражнений помещают в спец. емкость с 30% глицериновой смесью и пересевают на дифференциальные среды Эндо, Плоскарева, Висмут-сульфитный агар и на селективную среду.

**Моча:** Если нет возможности взять мочу из катетера, производят гигиену мочеиспускательного канала физ-раствором, первую порцию сливают, затем 20-50 мл мочи центрифугируют и засевают на дифференциальные и селективные среды

**Желчь:** Собирают натошак, дуоденальным зондированием в стерильные пробирки отдельно порции А, В и С с последующим посевом

**Рвотные массы:** если густые – разводят физраствором в соотношении 1:10. 2-3 капли из верхнего слоя засевают на дифференциальные среды и среды обогащения

Методы исследования : Бактериологический и серологический  
Исследование ведут по общей схеме.

На четвертый день исследования производят идентификацию выделенной культуры

| Вид бактерий | Тест     |          |             |         |           |       |                  |                    |         |
|--------------|----------|----------|-------------|---------|-----------|-------|------------------|--------------------|---------|
|              | лак-тоза | глю-коза | сахара-роза | ман-нит | маль-тоза | индол | H <sub>2</sub> S | лакму-совое МОЛОКО | желатин |
| Тиф          | —        | к        | —           | к       | к         | —     | +                | к                  | —       |
| Паратиф А    | —        | кг       | —           | кг      | кг        | —     | —                | к                  | —       |
| Паратиф В    | —        | кг       | —           | кг      | кг        | —     | +                | щ                  | —       |

**Серологическую идентификацию сальмонелл** начинают с реакции агглютинации на стекле с поливалентной О-сывороткой А, В, С, D, Е. При отсутствии агглютинации выделенную культуру испытывают с поливалентной О-сывороткой к редким группам сальмонелл. При положительной реакции с одной из сывороток культуру испытывают с каждой О-сывороткой, входящей в состав поливалентной, для определения О-серогруппы. Установив принадлежность культуры к О-группе, определяют ее Н-антигены с сыворотками первой, а затем второй фазы.

### Серологическая диагностика брюшного тифа и паратифов

**Реакция Видаля.** Со второй недели заболевания в крови больных накапливаются антитела против возбудителя инфекции. Для их выявления исследуют сыворотку крови больного в реакции агглютинации. В качестве антигена используют убитые культуры сальмонелл - диагностикумы.

Для постановки реакции Видаля используют сыворотку больного, набор диагностикумов, изотонический раствор натрия хлорида.

При возникновении инфекционного процесса - брюшного тифа или паратифов - в организме вырабатываются О- и Н-антитела к одноименным антигенам возбудителя.

| Диагностикумы из сальмонелл | Первичное исследование Повторное исследование |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                             | разведения сыворотки больного                 |       |       |       |       |       |       |       |
|                             | 1:100   | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 |
| Тиф О                       | +   | +     | —     | —     | +     | +     | +     | +     |
| » Н                         | +   | —     | —     | —     | +     | +     | —     | —     |
| Паратиф А О                 | +   | —     | —     | —     | +     | —     | —     | —     |
| » А Н                       | +   | —     | —     | —     | +     | —     | —     | —     |
| Паратиф В О                 | +   | —     | —     | —     | +     | —     | —     | —     |
| » В Н                       | +   | —     | —     | —     | +     | —     | —     | —     |

**Реакция Vi-гемагглютинации.** Это наиболее чувствительная реакция для выявления антител.

Принцип реакции заключается в том, что эритроциты человека (I группы) или барана после специальной обработки могут адсорбировать на своей поверхности Vi-антиген и приобретают при этом способность агглютинироваться соответствующими Vi-антителами.

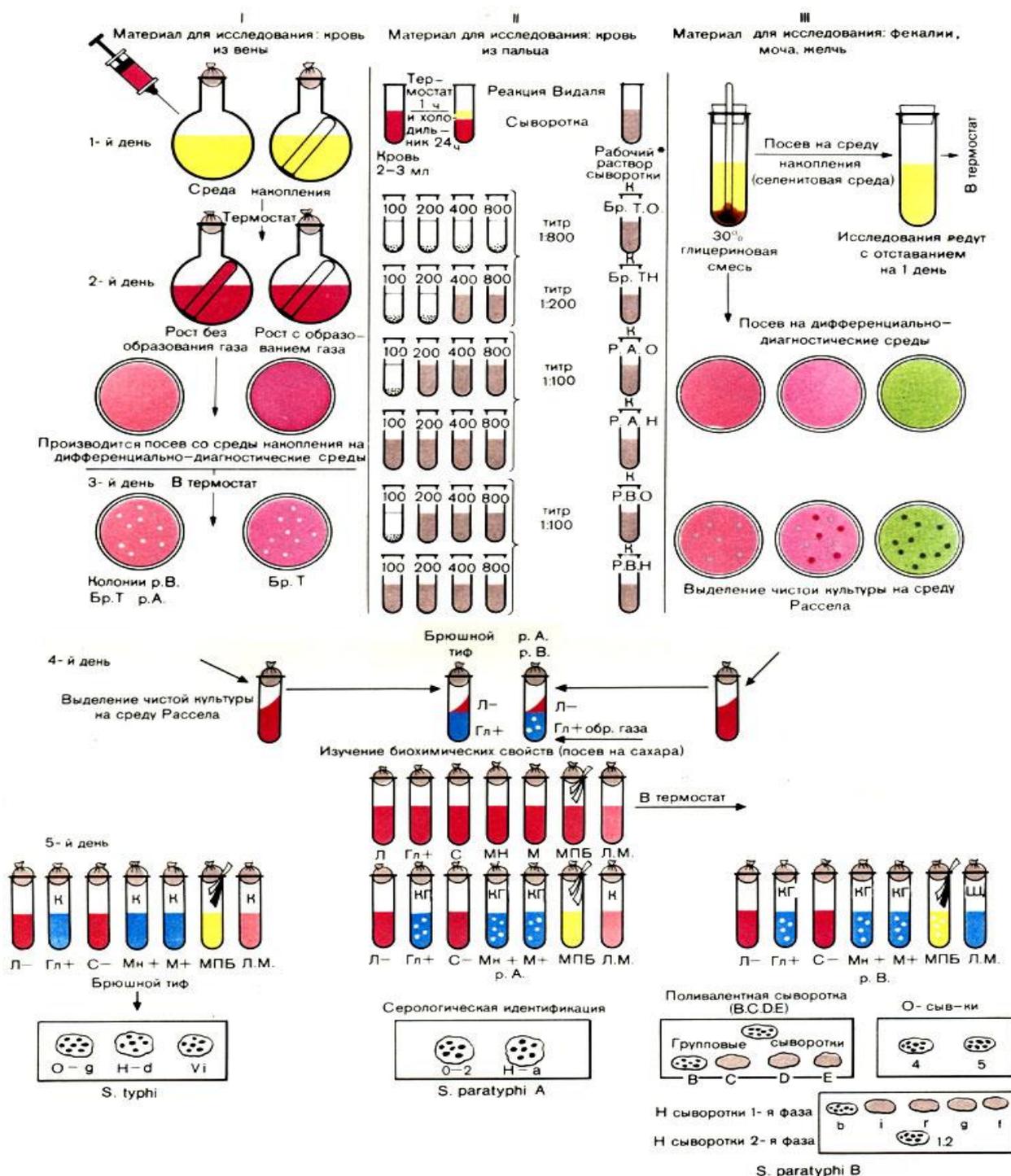
Из сыворотки крови готовят двукратные серийные разведения, начиная с 1:10 до 1:160. По 0,5 мл каждого разведения вносят в лунку и прибавляют по 0,25 мл эритроцитарного диагностикума. Реакцию ставят в объеме 0,75 мл.

Содержимое лунок тщательно перемешивают, ставят в термостат на 2 ч и оставляют при комнатной температуре до следующего дня (на 18-24 ч).

Реакцию оценивают в зависимости от степени агглютинации диагностикума.

Результаты учитывают по четырехкестной системе:

- ++++ эритроциты полностью агглютинированы - осадок на дне лунки в виде "зонтика";
- +++ "зонтик" меньше, не все эритроциты агглютинировались;
- ++ "зонтик" маленький, на дне лунки имеется осадок из неагглютинированных эритроцитов;
- реакция отрицательная; эритроциты не агглютинировались и осели на дно лунки в виде пуговки.



## Микробиологическая диагностика возбудителей гнойно-воспалительных инфекционных заболеваний.

Во всем мире отмечают резкое увеличение частоты гнойно-воспалительных заболеваний, осложняющих течение послеоперационного периода, заживление ожогов, послеродовой период. Такие заболевания называют клиническими, поскольку они возникают, как правило, в лечебных учреждениях разного профиля.

В настоящее время круг условно-патогенных микроорганизмов очень широк. К ним относятся многие представители семейства кишечных (клебсиеллы, протей, провиденсия, сerratия), кокковых (стафилококки, стрептококки группы В, энтерококки), синегнойная палочка, неспорообразующие анаэробы и др.

### Род Клебсиеллы - *Klebsiella*

Относится к семейству энтеробактерий, объединяет капсульные бактерии, вызывающие различные заболевания: пневмонию и гнойно-воспалительные процессы - *K. pneumoniae*, риносклерому - *K. rinoscleromatis*, озену (зловонный насморк) - *K. ozaenae*.

**Морфология.** Клебсиеллы - короткие толстые палочки, размером 0,6-6,0 × 0,3-1,5 мкм с закругленными концами. Неподвижны. Образуют капсулу. В мазках располагаются одиночно, попарно или короткими цепочками.

**Культивирование.** Клебсиеллы - факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых питательных средах при 35-37° С. На плотных средах образуют куполообразные слизистые колонии, на бульоне - интенсивное помутнение.

**Ферментативные свойства.** Ферментируют лактозу, расщепляют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, разлагают мочевины, не образуют индола и сероводорода.

### Микробиологическое исследование

**Материал для исследования:** мокрота, слизь из зева, гной из уха, отделяемое раны, испражнения, смывы с предметов окружающей среды.

Таблица 8 - Способы сбора материала:

|  |   |
|--|---|
| <b>Мокрота</b>   | Собирают натошак, после того как больной почистит зубы и прополощет ротовую полость. Мокроту собирают в стерильную баночку с притертой пробкой или закрытую вощаной бумагой |
| <b>Слизь из зева и носа, гной из уха, отделяемое раны и другой патологический материал</b> | Материал забирают стерильными ватными тампонами, помещенными в стерильные пробирки  |
| <b>Испражнения</b>   | Собирают так же, как и при других кишечных инфекциях  |
| <b>Смывы с предметов окружающей среды</b>  | Стерильными тампонами, помещенными в изотонический раствор натрия хлорида, делают смыв с различных предметов  |

## Ход исследования

### Первый день исследования

Делают посев на чашки Петри с МПА, средой Эндо и Плоскирева, глюкозный бульон.

### Второй день исследования

Делают мазки, окрашивают по Граму. При наличии амотрицательных палочек отбирают слизистые колонии (4-5) и пересевают их на скошенный агар и среду Ворфель - Фергюсона (для выделения чистой культуры) и на комбинированную среду Рассела (или среду с мочевиной) для определения ферментативных свойств и подвижности. В пробирку под пробку опускают полоски бумаги, пропитанные реактивами для определения индолообразования и сероводорода.

Делают высев из глюкозного агара на плотные питательные среды для проведения (если понадобится) дополнительного исследования.

### Третий день исследования

При росте неподвижной культуры, ферментирующей лактозу, глюкозу, мочевины, не образующей индола и сероводорода, делают посев на среды с цитратом и малонатом и мазки для определения наличия капсулы. При наличии капсулы ставят реакцию агглютинации на стекле с агглютинирующими К-сыворотками. Просматривают дополнительный посев на плотные питательные среды. Можно выдать ориентировочный ответ: "Выделены клебсиеллы".

### Четвертый день исследования

Производят учет результатов посева на среду с цитратом, малонатом (рост) и другими углеводами (типа Рассела или Олькеницкого). Выдают окончательный ответ: "Выделены клебсиеллы (K11)".

## Серологическая диагностика

На 7-8-й день болезни при подозрении на заболевание риносклеромой ставят РСК с сывороткой больного в разведении 1:100 - 1:1600 и склеромным диагностикумом из убитых клебсиелл склеромы. Нарастание титра антител в динамике заболевания является подтверждением диагноза.

## Род Протей - *Proteus*

Относится к семейству энтеробактерий, объединяет несколько видов, отличающихся способностью ферментировать многие питательные субстраты.

**Морфология.** Бактерии всех видов этого рода мелкие, полиморфные грамотрицательные палочки. Средний размер 0,4-0,6 × 1,0-3,0 мкм. Подвижны, перитрихи. Спор и капсул не образуют.

**Культивирование.** Протеи - факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах при 20-37° С. Некоторые виды

дают ползучий рост на плотной питательной среде, а при посеве в конденсационную воду скошенного агара - рост по всей поверхности среды (способ выделения чистой культуры по Шукевичу).

**Ферментативные свойства.** Обладают сахаролитическими и протеолитическими ферментами.

### Микробиологическое исследование

**Материал для исследования:** испражнения, рвотные массы, моча, слизь из зева, гной из уха, отделяемое раны, секционный материал. смывы с предметов окружающей среды.

#### Способы сбора материала

|   |   |
|---|---|
| Испражнения   | Собирают так же, как и при других кишечных инфекциях  |
| Рвотные массы   | Собирают так же, как и при пищевых токсикоинфекциях   |
| Моча  | Собирают стерильным катетером среднюю порцию в стерильную посуду (банку, пробирку, флакон)  |
| Отделяемое раны, гной из уха, слизь из зева и носа и другой патологический материал | Собирают стерильным тампоном в стерильные пробирки  |
| Секционный материал   | Стерильным инструментарием в стерильные банки или чашки Петри, предварительно прижигая поверхность ткани и органа, из которых берут образец |
| Смывы с предметов окружающей среды  | Стерильными тампонами, помещенными в изотонический раствор натрия хлорида, делают смыв с поверхности различных предметов                    |

**Основные методы исследования:** микробиологический. И серологический.

#### Ход исследования

##### Первый день исследования

| Исследуемый материал   | Методы исследования                                     |
|--|---|
| Испражнения, рвотные массы, моча, тампоны с исследуемым материалом | Делают посев на чашки Петри со средой Эндо и Плоскирева |

## **Второй день исследования**

Отмечают характер роста на питательных средах (роение - вуалеобразный налет).

Выделяют отдельные колонии или часть сплошного роста на комбинированную среду Рассела (с мочевиной) или среду Олькеницкого, делают посев в конденсационную воду пробирки со скошенным агаром (по Шукевичу).

## **Третий день исследования**

Делают мазок и окрашивают его по Граму. При наличии грамотрицательных мелких палочек учитывают характер роста на среде Рассела или Олькеницкого и наличие роста в пробирке с посевом по Шукевичу. Протей не ферментирует лактозу, сбраживает глюкозу с образованием газа, большей частью гидролизует мочевины.

В пробе по Шукевичу - рост по всей поверхности скошенного агара.

Производят посев на дополнительные среды "пестрого ряда": маннит, бульон (для определения индолообразования и образования сероводорода вкладывают в пробирку бумажки, смоченные соответствующими реактивами), полужидкий агар, желатин. Делают посев на среду с аминокислотой фенилаланином.

## **Четвертый день исследования**

Учитывают результаты посева: протей не ферментирует маннит (большинство штаммов), образует индол и сероводород, подвижен, разжижает желатин и образует фермент фенилаланиндезаминазу, изменяющую цвет в пробирке с аминокислотой фенилаланином. При указанных результатах можно отнести выделенную культуру к роду *Proteus*.

Заключительным этапом исследования является постановка реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими сыворотками к бактериям рода *Proteus*. Сначала ставят реакцию агглютинации с поливалентными О-сыворотками. При положительной реакции с одной из них повторяют реакцию агглютинации с каждой из типовых О-сывороток, входящих в поливалентную.

После определения О-группы проводят реакцию с Н-сыворотками и определяют серовар. Выдают ответ: "Выделены *Proteus* 09:Н 1,2".

## **Род Иерсинии - *Yersinia***

Относится к семейству энтеробактерий, включает несколько видов: *Yersinia pestis* - возбудитель чумы; *Yersinia pseudotuberculosis* - возбудитель псевдотуберкулеза, *Yersinia enterocolitica* и др.

*Yersinia enterocolitica* широко распространены в природе. Обычно они обитают в организме грызунов, часто встречаются у домашних животных.

**Морфология.** Мелкие грамтрицательные палочки с закругленными концами. Средний размер 0,8-1,2 × 0,3-0,7 мкм, но в старых культурах могут быть длиннее и иметь вид нитей. Подвижны. Спор не образуют.

**Культивирование.** Факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых питательных средах. Наиболее благоприятна для роста температура 22-28° С.

На МПА образуют мелкие блестящие бесцветные колонии (росинки), увеличивающиеся при удлинении сроков выращивания (при 22-25° С). При культивировании при 37° С колонии непрозрачны, имеют неровный фестончатый край и выпуклый центр.

Могут расти при высоком содержании натрия хлорида в среде (до 4%).

**Ферментативные свойства.** Расщепляют глюкозу без образования газа, не ферментируют сахарозу. Сероводород не образуют, образование индола непостоянно.

### Микробиологическое исследование

**Материал для исследования:** испражнения, рвотные массы и промывные воды желудка, кровь, моча, слизь из зева и носа, отделяемое раны, секционный материал.

#### Способы сбора материала

|  |   |
|--|---|
| Испражнения                                  | Собирают так же, как при всех кишечных инфекциях                        |
| Рвотные массы и промывные воды желудка       | Собирают так же, как при токсикоинфекциях                               |
| Кровь  | Забор производят так же, как при брюшном тифе и паратифах               |
| Моча   | Собирают так же, как при других инфекциях                               |
| Слизь из зева и носа, отделяемое ран и т. п. | Собирают так же, как при заболеваниях, вызванных клебсиеллами и протеем |
| Секционный материал                          | То же   |

**Основной метод исследования:** Микробиологический

#### Ход исследования

##### Первый день исследования

| Исследуемый материал  | Методы исследования   |
|---|---|
| Испражнения, рвотные массы, промывные воды желудка, моча, мокрота, секционный материал, кровь | Производят посев на среду Эндо и ЭМС и буферную среду обогащения (рН 7,2). Посевы инкубируют при 20—28 °С |

### **Второй день исследования**

Просматривают посевы на среде Эндо, ЭМС. Выбирают мелкие круглые блестящие колонии. Выделяют на комбинированную среду Рассела или Олькеницкого. Чашки оставляют при 20-28° С. Делают высев со среды обогащения на среды Эндо или ЭМС.

### **Третий день исследования**

Повторно просматривают чашки с посевами. Выбирают более крупные колонии (0,1-0,2 мм), круглые с ровным краем, блестящие с розоватым оттенком. Выделяют на среду Рассела или Олькеницкого. Просматривают чашки с посевами со среды обогащения, выбирают вышеописанные колонии и выделяют их на среду Рассела или Олькеницкого.

Просматривают посевы на среде Рассела и Олькеницкого. Делают мазки и окрашивают их по Граму. При наличии мелких грамотрицательных палочек (иногда полиморфных), не ферментирующих лактозу, ферментирующих глюкозу и мочевины, не образующих сероводород, делают пересев для определения подвижности (при 18-20° С и 37° С) и в среды Гисса (маннит, мальтоза, сахароза, рамноза, желатин, цитрат).

### **Четвертый день исследования**

Повторяют просмотр чашек и комбинированных сред. Учитывают результаты роста на средах Гисса, агаре для определения подвижности, желатине.

При выделении грамотрицательных палочек, не расщепляющих лактозу, рамнозу, не образующих сероводорода, ферментирующих глюкозу, маннит, сахарозу, подвижных при 22° С и неподвижных при 37° С, дают ответ: "Выделены иерсинии энтероколитика".

## Дни 13 - 17

### Микробиологическая диагностика возбудителей госпитальных инфекций.

Госпитальная(внутрибольничная, оппортунистическая или нозокомиальная) инфекция вызывается условно-патогенными микроорганизмами на фоне иммунодефицита

Заболевания связанные с оказанием медицинской помощи - ятрогенные

#### Характеристика нозокомиальных инфекций

- высокая контагиозность
- возможность вспышки в любое время года
- наличие пациентов с повышенным риском заболевания
- Высокий риск рецидивов
- широкий спектр возбудителей

Выделяют 3 группы пациентов:

- 1) пациенты, инфицированный внутри стационара
- 2) пациенты, инфицированный в условиях поликлиники
- 3) медицинский персонал, инфицированный в условиях стационара и/или поликлиники

**Спектр возбудителей:** вирусы, грибы, бактерии, простейшие

Бактериальный пейзаж:

- 1) Стафилококки - до 60% -
- 2) Стрептококки пневмонийные
- 3) Грамотрицательные энтеробактерии
- 4) Псевдомонады
- 5) Анаэробы
- 6) Грибы рода кандиды

**Механизмы передачи:** фекально-оральный, воздушно-капельный, трансмиссивный, контактно-бытовой, ятрогенный

Штаммы бактерий от пациентов с внутрибольничными инфекциями более вирулентны и устойчивы к а/б препаратам. Ситуация осложняется постоянным поступлением новых микроорганизмов извне.

**Источник инфекции:** больные, посетители, мед.работники

Первичные симптомы развиваются быстро и часто внезапно, могут быть совершенно различного генеза и объединяются лишь повышением температуры тела

## Нозологические формы нозокомиальных инфекций:

| Инфекции                  | Доля среди НИ, % |
|---------------------------|------------------|
| Нижних дыхательных путей  | 42,4             |
| Мочевыводящих путей       | 19,0             |
| Кожи и мягких тканей      | 13,4             |
| Абдоминальные             | 11,4             |
| Ангиогенные               | 4,8              |
| Костей и суставов         | 3,1              |
| Верхних дыхательных путей | 2,8              |
| ЦНС                       | 2,1              |
| Клостридиальный колит     | 1,0              |

### Микробиологическое исследование

При микробиологическом исследовании определяют вид инфекционного агента и тип стационара.

#### Забора материала

Ятрогенная инфекция развивается после мед.вмешательства, посещения ЛПУ, контакта с инфицированным посетителем и т.п. Симптомы появляются через некоторое время, продолжительностью не менее инкубационного периода (2-4 суток). Косвенный признак – внезапный скачек температуры тела после процедур.

#### Правила забора проб:

- 1) Забор в стерильные контейнеры с соблюдением правил асептики
- 2) Максимально быстрая доставка в лабораторию ( допустимый интервал – в течении часа)
- 3) Регулярный отбор проб

#### Бактериологическое исследование

Для постановки диагноза осуществляется забор соответствующих проб и бактериологическое исследование. При подозрении на конкретный микроорганизм проводятся дополнительные серологические и биохимические тесты, определение лекарственной чувствительности, а в некоторых случаях и пцр – диагностика. само бактериологическое исследование является ориентировочным.

Морфологические свойства изучаются при микроскопии колоний, выросших на плотных и жидких питательных средах. Мазки фиксируются на

предметных стеклах физическими ( над пламенем горелки) и химическими методами(фиксаторами, чаще всего в роли них выступают спирты), окрашиваются по Граму. При просмотре мазков оценивается вся имеющаяся микрофлора.

Культуральные свойства изучают при визуальном просмотре культур на плотных и жидких питательных средах.

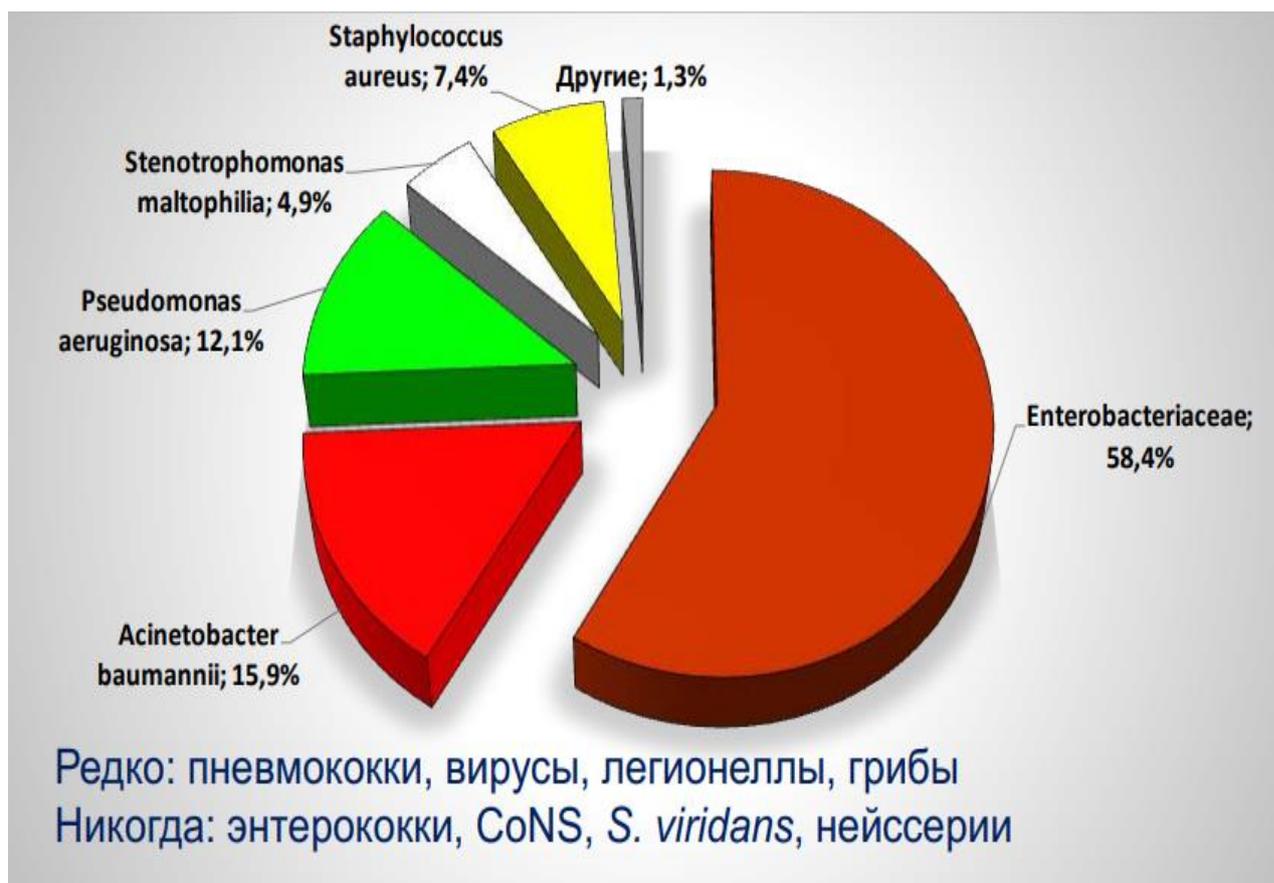
На плотных: учитывается размер колоний, цвет, прозрачность, форма

На жидких средах: - прозрачность, наличие осадка, пленки на поверхности среды, характер осадка

Далее изучаются ферментативные (биохимические) свойства – определяется ферментативная сахаролитическая активность, способность усваивать питательные вещества в аэробных и анаэробных условиях.

Антигенные свойства изучаются при взаимодействии бактерий и их антигенов, соответствующим антителам диагностических сывороток:РА, ИФА, РНГА, РИФ.

### Частота выделения различных возбудителей



## Характеристика некоторых представителей

### Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб)

Являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. В эту группу входят: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Listeria*, *Legionella*, и другие менее значимые микроорганизмы.

### Синегнойная палочка - *Pseudomonas aeruginosa*

Относится к семейству *Pseudomonadoceae*, или *Enterobacteriaceae*, роду *Pseudomonas*.

Эти бактерии широко распространены во внешней среде, постоянно обитают в организме человека и животных. Наиболее часто являются причиной устойчивых внутрибольничных инфекций. Имеют наибольшее значение у пациентов с иммунодефицитами.

**Морфология.** Мелкие грамотрицательные палочки. Средний размер 1,5-3,0 × 0,5-0,8 мкм. Подвижны, лофотрихи. Спор не образуют. Иногда образуют капсулоподобную внеклеточную слизь.

**Культивирование.** Строгие аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах. Оптимальная температура роста 37° С, но могут расти и при 5-42° С. На МПА образуют колонии размером 2-5 мм, круглые, полупрозрачные, голубовато-серые с перламутровым оттенком; на МПБ дают помутнение и образуют пленку.

Характерным признаком *P. aeruginosa* является пигменто- и ароматообразование. Большинство штаммов образует сине-зеленый пигмент - пиоцианин, окрашивающий питательную среду. Пиоцианин растворим в воде. Он обладает антагонистическими свойствами в отношении многих бактерий, но токсичен и поэтому не используется с лечебной целью. Почти все штаммы *P. aeruginosa* имеют характерный запах жасмина.

**Ферментативные свойства.** Ферментирует только один углевод - глюкозу. Протеолитическая активность хорошо выражена: разжижает желатин и свернутую сыворотку, свертывает молоко. Дает положительную реакцию на цитохромоксидазу.

### Микробиологическое исследование

**Материал для исследования:** слизь из зева и носа, отделяемое раны, кровь, моча, секционный материал, смывы с предметов окружающей среды и рук персонала.

## Способы сбора материала

Отделяемое ран, слизь из зева и носа  
Кровь

Материал собирают так же, как для выделения протей, клебсиелл и т. д.

Берут так же, как для выделения сальмонелл тифа

Моча

Собирают так же, как для выделения сальмонелл тифа

Секционный материал

Собирают так же, как для выделения протей, клебсиелл и т. д.

Смывы с различных предметов и рук персонала (хирургический инструментарий, перевязочный материал, белье и пр.)

Собирают так же, как для выделения эшерихий

**Основной метод исследования:** Микробиологический.

## Ход исследования

### Первый день исследования

| Исследуемый материал  | Методы исследования  |
|---|--|
| Отделяемое ран, слизь из зева и носа, моча, секционный материал | Делают посев на питательный агар и бульон                        |
| Кровь   | Делают посев во флаконы с питательным агаром и сахарным бульоном |
| Смывы с различных предметов и рук                               | Делают посев в пробирки с бульоном                               |

### Второй день исследования

Просматривают чашки и пробирки с посевами. Отбирают чашки, в которых среда окрашена в синевато-зеленоватый цвет и имеет запах жасмина (земляничного мыла). Дают ориентировочный ответ: "Выделена культура *P. aeruginosa*".

Выделяют колонии на пробирки с лактозой и на пробирки со скошенным агаром. Заливают вазелиновым маслом (создают анаэробные условия).

Если на чашках нет роста или сомнительный результат, отбирают пробирки с бульоном с признаками роста и высевают на чашки с питательным агаром. Просматривают флаконы, при наличии признаков роста делают высев на чашки с питательным агаром.

### Третий день исследования

Отбирают пробирки, в которых лактоза не расщеплена. Из культуры в пробирке со скошенным агаром делают мазок, окрашивают по Граму - наличие грамотрицательных палочек подтверждает выделение *P. aeruginosa*. Ставят пробу на цитохромоксидазу. Проба должна быть положительной.

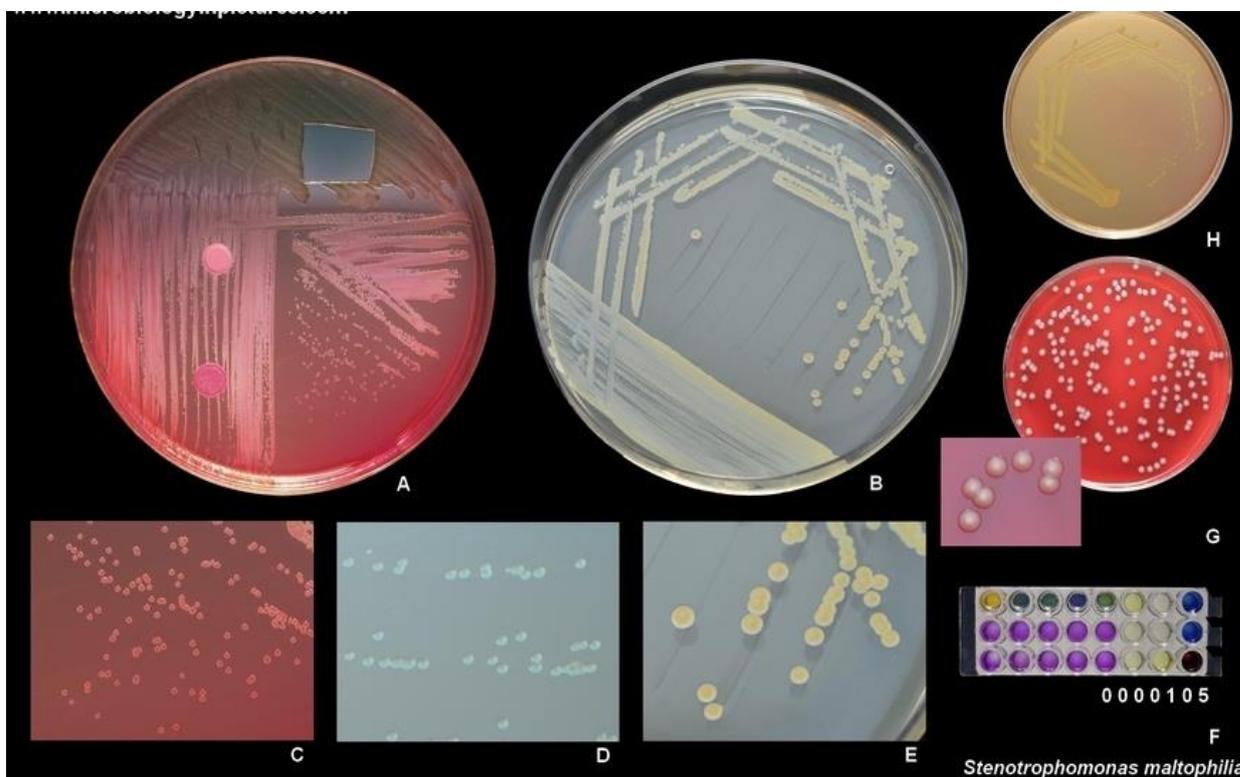
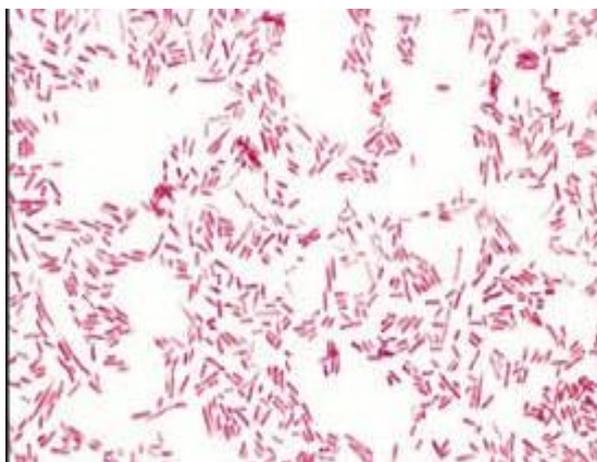
По совокупности всех признаков: наличие сине-зеленого пигмента, запах жасмина, грамотрицательные палочки, отсутствие расщепления

лактозы в анаэробных условиях, положительная проба на цитохромоксидазу выдают ответ: "Выделена культура *P. aeruginosa*".

Если исследование не закончено, продолжают по той же схеме.

## **Stenotrophomonas Maltophilia**

Семейство Xanthomonadaceae Род *Stenotrophomonas* (ранее *Pseudomonas*, I *Xanthomonas*) Возбудитель *Stenotrophomonas S.maltophilia* — прямые палочки, обычно 0,4 — 0,7x0,7 — 1,8 мкм, подвижны за счет жгутиков. Микроорганизм широко распространен в окружающей природной среде (почва, сточные воды, растения) . Многократно описаны факты выделения возбудителей из объектов больничной среды (контуры и другие составные части аппаратов искусственной вентиляции легких, небулайзеров, дезинфицирующие и



диализные растворы, сосудистые и мочевые катетеры и т.д.)

### **Значение *S.maltophilia***

определяется как тяжестью инфекционного процесса, так и трудностью антибактериальной терапии, формированием полирезистентных штаммов.

При этом следует отметить сложности диагностики данного возбудителя, так как традиционные методы дисковой диффузии для этого не подходят. *S.maltophilia* обладает множественными механизмами как природной, так и приобретенной устойчивости к антибактериальным препаратам (антибиотики, антисептики, дезинфицирующие средства). Микроорганизм вырабатывает бета-лактамазы. Как и синегнойная палочка, *S.maltophilia* может не только сохраняться, но и размножаться в растворах нитрофурановых препаратов. Кроме того, *S.maltophilia* способна к образованию микробных биопленок на поверхностях больничной среды, на внутрисосудистых катетерах, дренажах, составляющих компонентах оборудования для проведения искусственной вентиляции легких, раневых поверхностях и слизистых оболочках пациентов. Напомним, что биопленки представляют собой несколько слоев микробных клеток, покрытых общим гликокаликсом — полимером полисахаридной природы. Большинство клеток в биопленке находится в состоянии покоя и характеризуется крайне низкой чувствительностью к воздействию антибиотиков (снижена в 100—1000 раз), антисептиков и дезинфицирующих средств, повышением устойчивости к влиянию иммунной системы и других факторов макроорганизма.

#### **Устойчивость *Stenotrophomonas maltophilia* к факторам внешней среды, дезинфицирующим средствам**

*S.maltophilia* достаточно устойчива к факторам внешней среды. Описаны факты сохранения данного возбудителя в антисептике, содержащем хлор-гексидин с цетримидом, растворе фурацилина, в дезинфицирующих средствах. Микроорганизм способен не только сохраняться в дезинфицирующих растворах, но и расщеплять их, например фенол. Устойчивость к факторам внешней среды увеличивается при образовании биопленки.

#### **Вызываемые болезни**

*S.maltophilia* могут вызывать инфекции, связанные с внутрисосудистыми устройствами, в области хирургического вмешательства, мочевых путей, эндофтальмиты, внутрибольничные пневмонии, бактериемии, сепсис. Чаще всего заболевают пациенты с ослабленным иммунитетом.

#### **Идентификация**

Стандартная видовая идентификация бактериологическим методом редко дает результаты, применяют ПЦР диагностику

### **Моракселла - *Moraxella***

**Морфологические свойства:** грамотрицательные бактерии, короткие палочки (часто полиморфны), мелкие. Неподвижные, но благодаря наличию фимбрий у палочковидных форм возможна «дергающаяся» подвижность; способны образовывать капсулу.

**Культуральные свойства:** Строгие аэробы, оптимум рН 7,0-7,5. Прихотливы к условиям культивирования. На плотной среде образуют: шероховатые колонии с неровными краями – у свежесыводенных культур; гладкие с ровными краями;

Растет на питательном агаре и на среде, содержащей аминокислоты, минеральные соли, биотин, лактат, сукцинат.

### **Род Листерия - *Listeria***

**Морфологические свойства:** палочки средней величины, часто расположены цепочкой из 3-5 клеток в виде палисадника. В старых культурах дают кокковидные формы. Спор и капсул не образуют. Перетрихи.

**Культуральные свойства:** оптимальные среды для роста: глюкозно-глицериновый сывороточный агар (бульон), среды с печенью кролика. Подвижны при 20-25 °С, при 37 °С неподвижны. Аэробы, растут при температуре от 4 до 38 °С; оптимум рН 7,2-7,4. На твердых средах образуют сплошной тонкий голубоватый налет (при сплошном посеве).

Культура имеет запах молочной сыворотки; на кровяном агаре – окружена зоной β-гемолиза.

На жидких средах – равномерное помутнение с последующим выпадением слизистого осадка, или зернистого осадка в виде голубоватой пленки, оседающей хлопьями на дно. На полужидких средах растет по уколу.

### **Род Легионелла - *Legionella***

**Морфологические свойства.** Тонкая палочка, способна к полиморфизму, грамотрицательная, подвижная, спор не образует. Окрашивание по Романовскому-Гимзе и Хименесу; жировые включения окрашивают суданом черным.

**Культуральные свойства:** Внутриклеточный паразит, аэроб. Лучшей средой для культивирования является агар Мюллера-Хинтона с цистеином и ионами железа; угольно-дрожжевой агар. На твердой питательной среде на 3-5 сут образуются серые стекловидные колонии, оптимальная температура роста 35 °С, рН 6,9. Из жидких сред можно использовать для посева только бульон на основе дрожжевого экстракта с железом и цистеином.

## **Ферментирующие бактерии**

### **Гемофильная палочка *Haemophilus influenzae***

Один из основных возбудителей заболеваний верхних дыхательных путей.

**Морфология:** Очень мелкие, полиморфные от кокковидных до длинных нитевидных форм палочки. Неподвижны, Г-, хорошо окрашиваются слабыми концентрациями раствора фуксина. в мазках часто располагаются в виде скоплений. Неустойчивы к внешней среде, быстро погибают вне живого организма. для культивирования требуют присутствия фактор роста X и V X

фактор связан с гематином, находящимся в крови. Не разрушается при нагревании до 120 градусов С. V фактор содержится в некоторых животных и растительных тканях, вырабатывается некоторыми бактериями, термолабилен

Культивирование: оптимальными средами являются кровяной агар и агар Левинталя. На кровяном агаре вырастают мелкие плоские с выпуклым центром прозрачные колонии. На агаре Левинталя - колонии больших размеров, куполообразные. В жидких кровяных средах дают гомогенный рост с небольшим порошковидным осадком на дне.

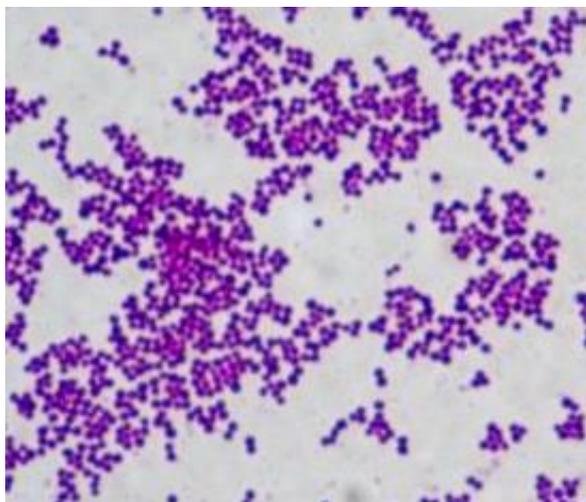
Ферментативные свойства: не постоянны. Сбраживают глюкозу, декстрозу, галактозу, мальтозу, сахарозу с образованием кислоты. Никогда не сбраживают лактозу и маннит. Патогенны для лабораторных животных.

Имеют специфический мышинный запах.

### **Стафилококки**

Стафилококки относятся к семейству Staphylococcaceae, роду Staphylococcus. Наибольшее клиническое значение имеют: *S. aureus*, *S. epidermidis* (эпидермальный стафилококк), *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*; коагулазоотрицательные *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. caprae*, *S. pasteurii*, *S. xylosum*. Выделяют штаммы, устойчивые к метицилину (MRSA) и ванкомицину (VRSA).

**Морфология.** Стафилококки (от греч. staphyle - виноградная гроздь) имеют вид круглых шаров диаметром 0,5-1,5 мкм. Размножаясь, образуют скопления в виде грозди винограда. Такая форма является результатом деления микробов в различных плоскостях. Однако в гное встречаются единичные и парные кокки. Стафилококки неподвижны, не имеют спор, при специальных условиях культивирования образуют микрокапсулу, грамположительны.



**Колонии *S. aureus*  
на желточно-солевом агаре**



**Культивирование.** Стафилококки - факультативные анаэробы, однако лучше растут в присутствии кислорода. Растут и размножаются на обычных питательных средах, хорошо растут на средах с кровью, оптимальные условия - температура 37° С, рН 7,2-7,4.

Элективными средами являются желточно-солевой агар и солевой агар. На МПА колонии стафилококка выпуклые, круглые, непрозрачные, блестящие, размером 2-4 мм с ровными краями. При росте стафилококки образуют пигмент: золотистый, лимонно-желтый или белый. Лучше всего пигмент образуется на молочной среде при комнатной температуре и рассеянном свете. Стафилококковый пигмент не растворяется в воде, растворяется в ацетоне, эфире, спирте и т. д. При росте некоторых штаммов стафилококка на агаре с кровью вокруг колонии образуется зона гемолиза. Рост на бульоне характеризуется равномерным помутнением и осадком на дне.

### Ферментативные свойства

| Вид стафилококка        | Свойства             |                     |                         |                                   |   |   |                               |
|-------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|---|-------------------------------|
|                         | плаз-мо-коа-гуля-ция | про-дук-ция ДНК-азы | про-дук-ция фос-фа-тазы | α-ге-моли-ти-чес-кая ак-тив-ность | расще-пление ман-нита в анаэ-робных усло-виях | расще-пление ман-нита в аэро-бных усло-виях | устой-чивость к по-вобно-цину |
| <i>S. aureus</i>        | +                    | +                   | +                       | +                                 | +   | +   | -                             |
| <i>S. epidermidis</i>   | -                    | -                   | +                       | -                                 | -   | -   | -                             |
| <i>S. saprophyticus</i> | -                    | -                   | -                       | -                                 | -   | +   | +                             |

| Вид микроба            | Тест                                    |                      |                           |                      |         |
|------------------------|---|----------------------|---------------------------|----------------------|---------|
|                        | реакция пла-змокоагу-ляции через 3—24 ч | гемолиз эритро-цитов | лецити-назная актив-ность | расще-пление маннита | ДНК-аза |
| Золотистый стафилококк | +                                       | +                    | +                         | +                    | +       |

Установлено, что патогенные стафилококки выделяют вещества, губительно действующие на лейкоциты человека и различных видов животных. Эти вещества получили название лейкоцидинов. У стафилококков описано четыре типа лейкоцидинов. Они обладают антигенными свойствами. "При иммунизации животных можно получить иммунную сыворотку, обладающую способностью нейтрализовать лейкоцитолитическое действие яда.

**Устойчивость.** Среди патогенных микробов стафилококки наиболее устойчивы во внешней среде. Они хорошо переносят замораживание, сохраняя при этом жизнеспособность в течение нескольких лет, и высыхание, являясь в дальнейшем источником пылевой (воздушной) инфекции. Прямой солнечный свет убивает стафилококки в течение нескольких часов. При нагревании до 70°C они погибают в течение 1 ч, до 80°C — через 10—20 мин. Менее устойчивы стафилококки к действию различных химических веществ: 0,1% раствор сулемы и 3% раствор карболовой кислоты убивают их в течение 15—30 мин, 1% раствора хлорамина — через 2—5 мин. Стафилококки устойчивы к повышенной концентрации хлорида натрия. Поэтому при выделении их из загрязненного материала используют питательные среды с повышенным содержанием NaCl (7—10%). Стафилококки быстро приобретают устойчивость к антибиотикам. Особенно распространены штаммы, устойчивые к пенициллину, так как стафилококки обладают ферментом пенициллиназой.

### Микробиологическое исследование

#### Способы сбора материала

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Гной из пораженных участков        | Материал следует брать из глубоких слоев пораженного участка. При наличии открытых процессов гной берут стерильным тампоном, пастеровской пипеткой или платиновой петлей, при закрытых абсцессах — стерильным шприцем |
| Отделяемое слизистых оболочек зева | Материал отбирают стерильным тампоном   |
| Мокрота                            | Собирают в стерильную посуду  |
| Моча                               | Собирают в стерильную посуду (следует брать утреннюю мочу катетером)  |
| Дуоденальное содержимое            | В стерильные пробирки собирают порции А, В, С (можно все 3 порции в одну посуду)  |
| Кровь                              | 10—15 мл берут стерильно из локтевой вены   |
| Рвотные массы                      | Собирают в стерильную посуду  |
| Промывные воды желудка             | Собирают в стерильную посуду  |

#### Серологическая диагностика стрептококковой инфекции

Обнаружение полисахаридного Аг клеточной стенки (группоспецифический полисахарид С) в реакциях преципитации, латекс-агглютинации и др.

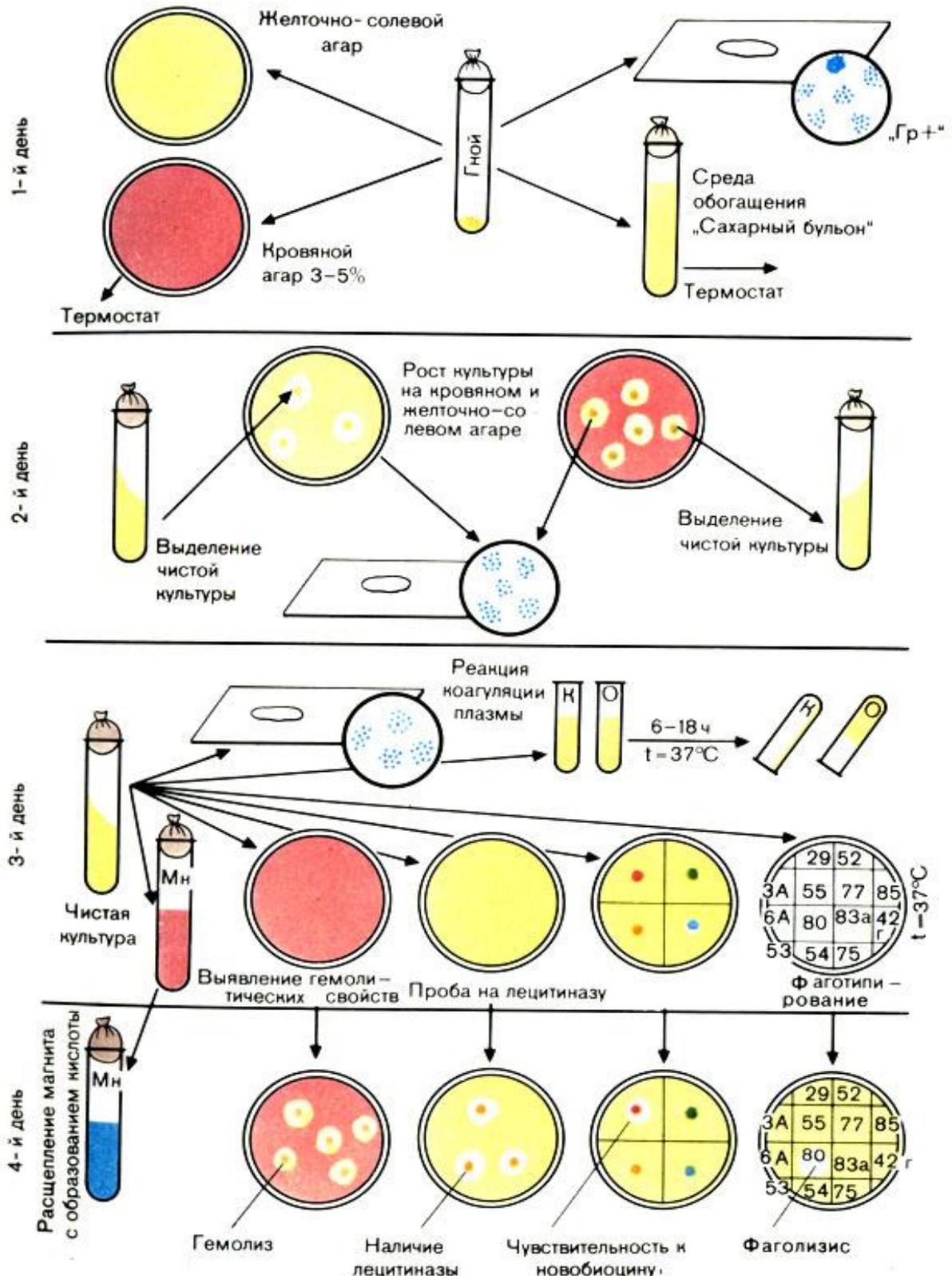
Определение в крови специфических стрептококковых Ат к стрептолизину о в парных сыворотках. Титры антистрептолизина О в норме — 250 МЕ, при острых и хронических стрептококковых инфекциях они возрастают (АЕ<sub>Sto</sub>).

Определение титра антигиалуронидазы (АЕ<sub>HуS</sub>) при диагностике активности ревматического процесса. В норме титр не превышает 300

единиц (АЕНуS), а у больных ревматизмом повышается до 1000 единиц и выше.\* Использование реакции коагулирования для выявления *Streptococcus pyogenes* группы А в клиническом материале.

• ИФА при диагностике стрептококков группы А (*Streptococcus pyogenes*) в нативном материале.

### Бактериологическое исследование



## Дни 17 - 19

### Дисбактериоз. Этапы исследования.

*Дисбактериоз кишечника* – динамическое изменение количественного соотношения и состава нормальной микрофлоры кишечника, повышение числа микроорганизмов-симбиотов в норме отсутствующих или встречающихся в небольшом количестве, сопровождающееся клиническими проявлениями

Нормальная микрофлора сопутствует своему хозяину на протяжении всей жизни, с современных позиций ее рассматривают как совокупность множества микроорганизмов, характеризующихся определенным видовым составом и занимающих тот или иной биотоп в организме. В любом микробиоценозе различают постоянно встречающиеся виды микроорганизмов — **облигатная** (строго постоянно встречающиеся представители), **факультативная** (не строго) микрофлора и добавочные — **транзиторные**. Характерных видов относительно немного, но они всегда представлены наиболее обильно. Видовой состав транзиторных видов микроорганизмов разнообразен, но они немногочисленны. Количественные колебания микроорганизмов в биоценозе могут достигать для некоторых видов несколько порядков и тем не менее укладываться в принятые нормы.

| <b>Состав микрофлоры толстого кишечника здорового человека</b> |   |
|--|---|
| Состав микробиоценоза  | Число клеток в 1г. испражнений                                      |
| <b>1. Облигатная</b>   |   |
| Бифидобактерии   | $10^8 - 10^{10}$  |
| Бактероиды   | $10^7 - 10^9$   |
| Лактобактерии  | $10^7 - 10^8$   |
| Кишечная палочка   | $10^6 - 10^9$ до 10 %   |
| Энетрококк (фекальный стрептококк)                             |   |
| <b>2. Факультативная (допустимо)</b>                           |   |
| Микрококки   | $0 - 10^3$ в сумме  |
| Стрептококки   |   |
| Пептострептококки  |   |
| Стафилококки   |   |
| Кампилобактерии  |   |
| Протей   | Менее $10^3$  |
| Дрожжеподобные грибы   | Менее $10^2$  |
| <b>3. Транзиторная</b>   |   |
| Клостридии   | Единичные и непостоянные при динамическом исследовании микроколонии |
| Синегнойная палочка  |   |
| Грибы рода кандиды   |   |
| <b>4. Патогенная микрофлора</b>                                |   |
| -  | Не должно быть  |
| Общее количество кокковых форм                                 | $0 - 10^4$  |

## Характеристика некоторых представителей.

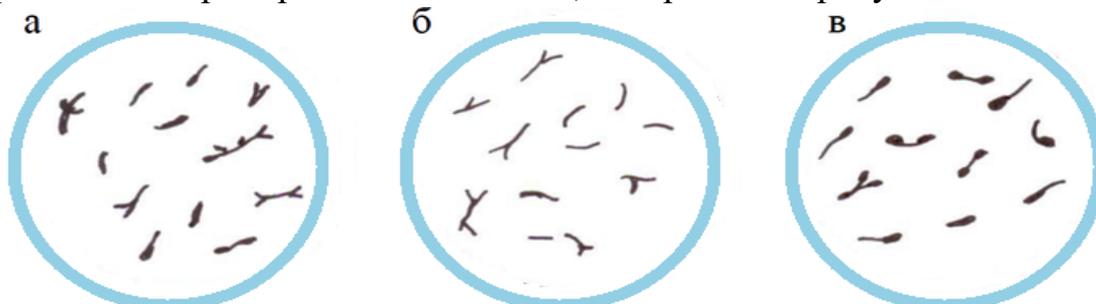
### Бифидобактерии

Принадлежат к семейству *Bifidobacteriaceae*, роду бифидобактерий.

**Морфология:** это Gr<sup>+</sup> полиморфные палочки, размером 0.5-1,3 × 1.5-8 мкм. Занимают доминирующее положение в облигатной микрофлоре кишечника здорового человека, обладают высокой антагонистической активностью. Своё название получили из-за характерного разветвления на конце палочек – бифиркаций.

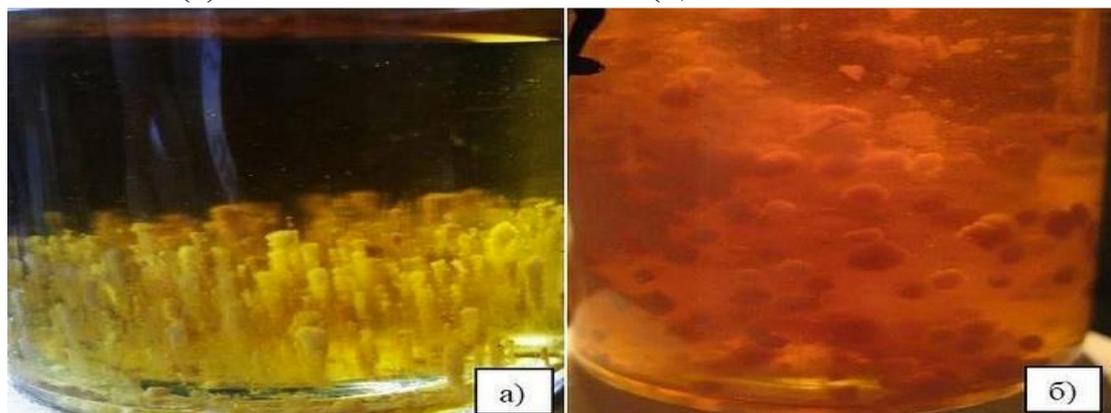


Некоторые виды могут расти в атмосфере, обогащенной до 10% CO<sub>2</sub>. Их рост прекращается при pH ниже 4.5 или выше 8.5. Как правило, при окрашивании препарата бифидобактерий по Граму, для них характерна биполярность. Однако и это правило не без исключения, так как некоторые штаммы бифидобактерий при прокрашивании приобретают вид клеток, содержащих гранулы



а – *B. bifidum*; б – *B. longum*; в – *B. adolescentis*

**Культуральные свойства:** строгие анаэробы. Селективной и накопительной питательной средой является среда Блоурокка. Культивирование проводится в пробирках в анаэробных условиях. В толще среды, бифидобактерии дают характерный придонный рост – в виде “точек с хвостиками” (а) или маленьких комочков (б).

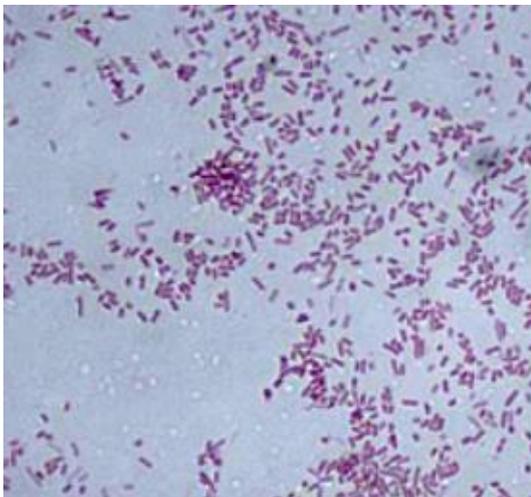


## Протей

Род *Proteus* семейства энтеробактерий объединяет несколько видов, отличающихся способностью ферментировать многие питательные субстраты.

**Морфология.** Бактерии всех видов этого рода мелкие, полиморфные грамотрицательные палочки. Средний размер 0,4-0,6 × 1,0-3,0 мкм. Подвижны, перитрихи. Спор и капсул не образуют.

**Культивирование.** Протеи - факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах при 20-37° С. Некоторые виды дают ползучий рост на плотной питательной среде, а при посеве в конденсационную воду скошенного агара - рост по всей поверхности среды (способ выделения чистой культуры по Шукевичу).



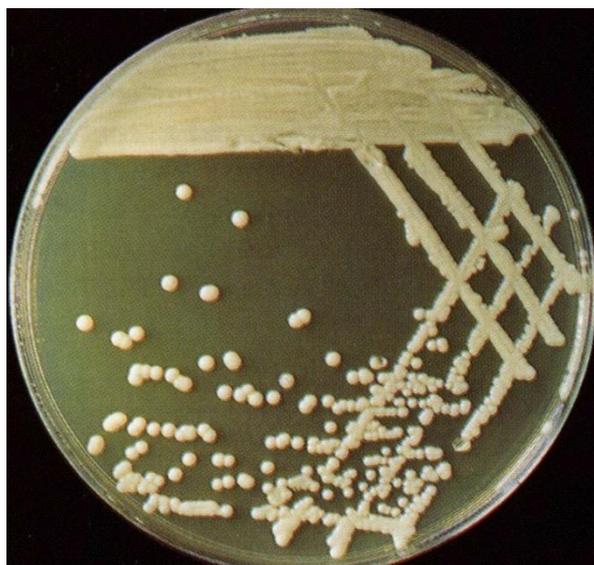
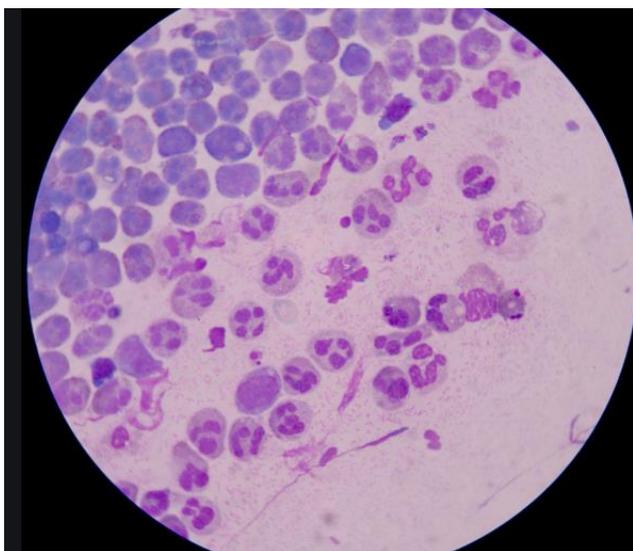
## Грибы рода Candida

Грибы - царство живых организмов Fungi или Mycetes, объединяющее эукариотические организмы, сочетающие в себе некоторые признаки как растений, так и животных. Вызывают микозы, наиболее распространенный из которых кандидомикоз, вызываемый грибами рода *Candida*, или дрожжеподобные грибы.

Все дрожжеподобные грибы широко распространены в природе. Возбудителем кандидоза чаще всего является *C.albicans* (до 62% случаев)

**Морфология:** одноклеточные организмы овальной формы. Размер 8—20 мкм, размножаются почкованием. В отличие от истинных дрожжей им свойственны диморфизм, то есть они способны иногда образовывать мицелий.

Размножаются бесполом вегетативным путем – почкованием, полностью отсутствует половое размножение.



**Культуральные свойства:** лучше растут на специальных питательных средах с добавлением углеводов (глюкозы), но могут размножаться и на простых. Оптимальная температура роста грибов – +22-36оС; рН – 5,8-6,5. Специальными средами для выращивания кандид являются глюкозо-пептонный агар, кукурузный питательный агар, среда Сабуро.

Колонии на глюкозо-пептонной среде при +25оС через 1-3 дня роста – молочно-белые, беловато-кремовые с тусклым блеском; вначале гладкие, влажные, при дальнейшей инкубации могут стать морщинистыми

В большинстве случаев появление грибов в результатах анализа означает чрезмерно тяжелое течение заболевания и увеличивает риск летального исхода.

### **Микробиологическое исследование**

Показания для микробиологической диагностики дисбактериоза кишечника:

- длительно протекающие инфекции и расстройства, при которых не удается выделить патогенные энтеробактерии;
- затяжной период реконвалесценции после перенесенной кишечной инфекции;
- дисфункции ЖКТ на фоне или после проведенной антибиотикотерапии или у лиц, постоянно контактирующих с антимикробными препаратами.
- болезнях злокачественного роста,
- у страдающих диспептическими расстройствами лиц подготавливаемых к операциям на органах брюшной полости,

- недоношенных или травмированных новорожденных,
- при наличии бактериемий и гнойных процессов, трудно поддающихся лечению (язвенные колиты и энтероколиты, пиелиты, холециститы и др.)

**Материал исследования:** испражнения

### **Сбор и доставка материала на дисбактериоз**

Кал собирается в сухие герметичные стеклянные или пластмассовые емкости с плотной крышкой и доставляется с соблюдением правил асептики не позже 2 часов после дефекации.

Для получения достоверного результата стул должен быть обязательно утренним, самостоятельным, не на фоне лечения. У грудных детей забирать материал не с памперсов и пеленок. Одну столовую ложку фекалий помещают в прокипяченную стеклянную баночку.

### **Бактериологическое исследование**

Титрованием определяют количество микроорганизмов в 1 г фекалий по числу колоний, выросших на соответствующих питательных средах, с пересчетом на количество посеянного материала и степени его разведения.

Так если на среде ЭНДо выросло 30 лактозонегативных колоний, при посеве 0,1 мл фекалий и разведения  $10^5$  в 1:100 000 при расчете следует  $30 * 10 * 100 000$ , т.е. в 1 г будет 30 000 000 лактозотрицательных энтеробактерий

Посевы изучают на наличие патогенных микроорганизмов и на нарушение соотношения различных видов микробов. Учитывают число лактозотрицательных гемолитических БГКП, наличие стафилококка, протей и др. Определяются ферментативные свойства и лекарственная чувствительность.

Результаты исследования следует считать объективными при анализе роста изолированных колоний в том числе, если можно изучить морфологию и подсчитать количество колоний на чашку Петри. После идентификации проводят пересчет содержания микроорганизмов каждого вида на 1 г исследуемого материала. При обнаружении патогенной микрофлоры необходимо изучить ее чувствительность к антибактериальным препаратам и бактериофагам.

### **Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта в норме**

| Виды бактерий                    | Средняя концентрация бактерий, мл или г |                   |                                  |                                    |
|----------------------------------|---|-------------------|----------------------------------|------------------------------------|
|                                  | Желудок                                 | Тонкий кишечник   | Подвздошная кишка                | Толстая кишка                      |
| Общее количество                 | 0-10 <sup>3</sup>                       | 0-10 <sup>5</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> | 10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup> |
| Аэробы и факультативные анаэробы |   |                   |                                  |                                    |

|                 |                   |                   |                                  |                                    |
|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Энетробактерии  | 0-10 <sup>2</sup> | 0-10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>  |
| Стрептококки    | 0-10 <sup>2</sup> | 0-10 <sup>4</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup>  |
| Стафилококки    | 0-10 <sup>2</sup> | 0-10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>9</sup>   |
| Лактобациллы    | 0-10 <sup>3</sup> | 0-10 <sup>4</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>  |
| Грибы           | 0-10 <sup>2</sup> | 0-10 <sup>2</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>   |
| <b>Анаэробы</b> |                   |                   |                                  |                                    |
| Бактероиды      | редко             | 0-10 <sup>3</sup> | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup> | 10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup> |
| Бифидобактерии  | редко             | 0-10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup> | 10 <sup>8</sup> -10 <sup>12</sup>  |
| Энтерококки     | редко             | 0-10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup> | 10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup> |
| Клостридии      | редко             | 0-редко           | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup>  |
| Эубактерии      | редко             | редко             | редко                            | 10 <sup>9</sup> -10 <sup>12</sup>  |

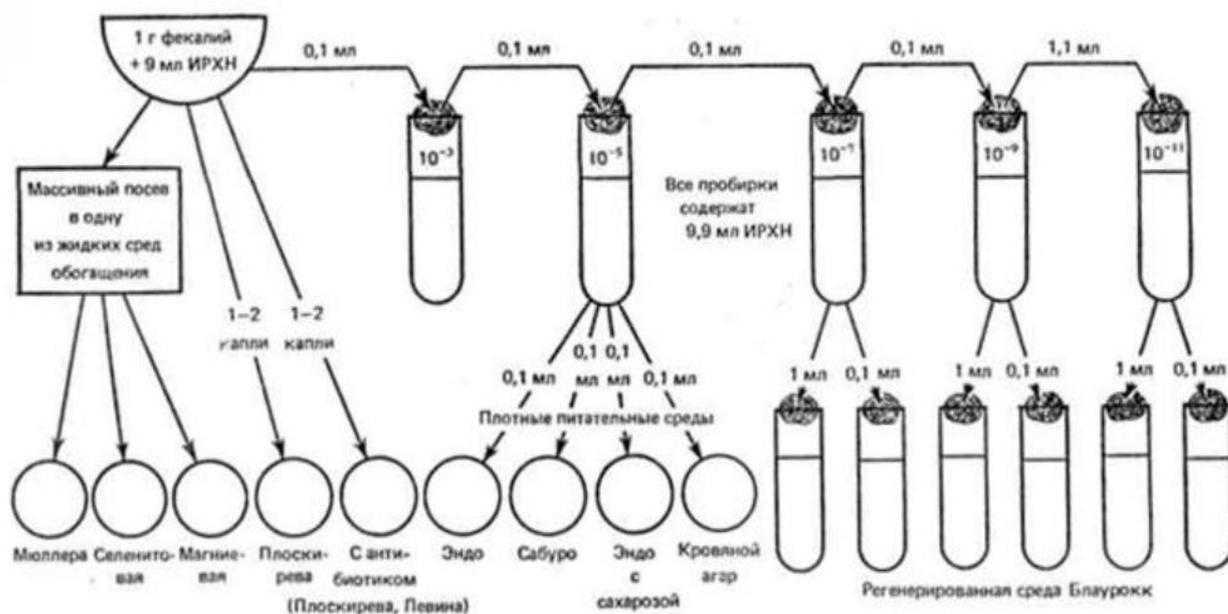
| Показатели                            | Норма   |
|---------------------------------------|---|
| Патогенные микробы семейства кишечных | 0   |
| Общее количество кишечной палочки     | 300-400*10 <sup>6</sup> млн   |
| Кишечная палочка с СФЛ                | До 10 <sup>4</sup>  |
| L-/кишечные палочки                   | До 5 %  |
| Кокковые формы в общей сумме микробов | До 25 %   |
| Гем. кишечной палочки St. aureus      | 0   |
| Стрептококки                          | 10 <sup>4</sup>   |
| Бифидобактерии                        | 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> взрослые<br>10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup> дети |
| Микробы рода Протей                   | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>  |
| Грибы рода Candida                    | 10 <sup>4</sup>   |
| Условно-патогенные микроорганизмы     | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>  |

**Цель исследования:** определения количества микроорганизмов наиболее значимых групп.

**Этапы бактериологического исследования:**

- 1) приготовление серийных разведений суспензии испражнений;
- 2) посев на питательные среды из разведений;
- 3) учет результатов посева и ориентировочная идентификация микроорганизмов;
- 4) оценка результатов.

## Схема бактериологического исследования:



## Дни 20-22

### Санитарно – бактериологическое исследование воздуха и смывов.

#### Санитарно – бактериологическое исследование воздуха

Воздух не является благоприятной средой для развития микроорганизмов, так как не содержит питательных веществ и находится в постоянном движении. Поэтому большинство микроорганизмов быстро исчезают из воздуха. Однако некоторые из них более устойчивые, например туберкулезная палочка, споры клостридий, грибов и другие, могут длительно сохраняться в воздухе.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

- проводится для определения количества МАФАНМ -мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, в 1 м<sup>3</sup> - посевом на МПА
- наличие санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов

**Основные показатели санитарного состояния воздуха следующие:**

- **Общее микробное число (ОМЧ)** воздуха – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 м<sup>3</sup> воздуха
- **Индекс санитарно-показательных микроорганизмов** –
  - *Staphylococcus aureus*.
  - Гемолитических стрептококков
  - Грибов.
  - Патогенных микроорганизмов.



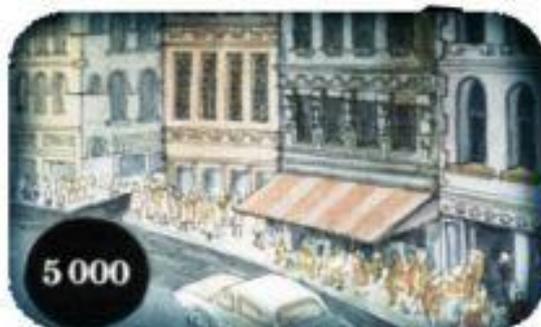
#### Отбор проб воздуха

Правильное взятие проб гарантирует точность исследования. В закрытых помещениях точки отбора проб устанавливаются из расчета на каждые 20 м<sup>2</sup> площади - одна проба воздуха, по типу конверта: 4 точки по углам комнаты (на расстоянии 0,5 м от стен) и 5-я точка - в центре. Пробы воздуха забираются на высоте 1,6—1,8 м от пола - на уровне дыхания в

жилых помещениях. Пробы необходимо отбирать днем после влажной



Непроветренная комната



Улица города

## Кол-во бактерий в 1см<sup>3</sup> воздуха



Горный воздух



Морской воздух

уборки и проветривания помещения.

### Методы отбора проб воздуха

Существуют два основных способа отбора проб воздуха для исследования:

1) *Седиментационный метод Коха* - основан на механическом оседании микроорганизмов;

2) *Аспирационный* - Основан на на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость

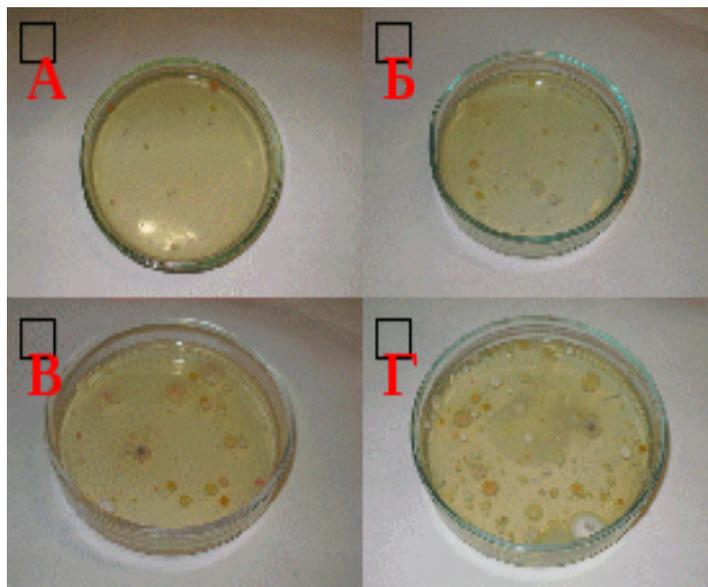
#### Седиментационный метод

Чашки Петри с питательной средой (МПА) устанавливают в открытом виде горизонтально, на разном уровне от пола. Метод основан на механическом оседании бактерий на поверхность агара в чашках Петри. Чашки со средой экспонируют от 10 до 20 мин, в



зависимости от предполагаемого загрязнения воздуха.

Для выявления патогенной флоры используют электрофильные среды. После экспозиции чашки закрывают, доставляют в лабораторию и ставят в термостат на 24 ч при температуре 37° С. На следующий день изучают выросшие колонии. Метод этот используют в основном в закрытых помещениях.



**Седиментационный метод имеет ряд недостатков:**

**на поверхность среды оседают только грубодисперсные фракции аэрозоля; нередко колонии образуются не из единичной клетки, а из скопления микробов; на применяемых питательных средах вырастает только часть воздушной микрофлоры.**

#### **Аспирационный метод**

Более совершенный метод, дает возможность определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий). Основан на работе приборов – бактериуловителей, принцип действия которых - улавливание бактерий в воздухе тем или иным способом, зависящим от устройства прибора.

#### **Электроаспиратор АПВ-4**

Принцип работы: При включении в корпусе воздуходувки прибора понижается давление, засасывается воздух извне и вновь возвращается наружу. Узнав затраченное время на его прохождение сквозь аспиратор и его скорость, можно определить объем воздуха, проходящего через поглотительный прибор, который присоединяется к штуцеру.



**Первый день исследования.** Отобранные пробы помещают в термостат при 37° С на 18-24 ч.

**Второй день исследования.** Чашку вынимают из термостата и производят подсчет колоний. Бактериальное загрязнение воздуха выражается общим числом микробов в 1 м<sup>3</sup> его.

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

| Место отбора проб                        | Время отбора проб       | Общее количество микроорганизмов | 1 м <sup>3</sup> воздуха на золотистый стафилококк | 1 м <sup>3</sup> воздуха на грамотрицательные бактерии |
|--|-------------------------|----------------------------------|--|--|
| Операционный блок                        | До работы               | Не более 100                     | Отсутствие   | Отсутствие   |
|  | После работы            | Не более 1000                    | Отсутствие   | Отсутствие   |
| Реанимационное отделение (палаты)        | Подготовленные к работе | Не более 1000                    | Не более 4   | Отсутствие   |
| Процедурная                              | До работы               | Не более 50                      | Отсутствие   | Отсутствие   |
|  | Во время работы         | Не более 1000                    | Не более 1-2                                       | Не более 1-2   |
| «Грязные» помещения – коридоры, офисы... | Не нормируются          | Не нормируются                   | Не нормируются                                     | Не нормируются   |

$$\text{Число микробов в 1 м}^3 \text{ воздуха} = 100 \times 1000 / 125 = 800$$

Оценка результатов и доведение до вида

### **Санитарно – бактериологическое исследование смывов.**

Смывы производят с рабочих поверхностей стерильными ватными тампонами.

Готовят стандартные разведения и производят посев на плотный агар в чашки Петри по обычной схеме с последующей инкубацией на 24 часа.

### **Санитарно-значимые микроорганизмы**

- 1. Наличие БГКП.
- 2. Наличие *S. aureus*.
- 3. Общее количество бактерий.
- 4. Исследования на патогенную микрофлору проводят только по эпидпоказаниям.
- В отделениях хирургического профиля, кроме вышеуказанных показателей, определяют количественную обсемененность микроорганизмами, наличие синегнойной палочки и протей.

## Отбор проб

Взятие проб осуществляют методом смывов. Используют ватные тампоны или салфетки 5×5 см, которые захватывают стерильным пинцетом. Тампоны и салфетки увлажняют, помещая их в пробирки с 2 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Смывы, как правило, берут с чистых, подготовленных к работе предметов, а с бывших в употреблении - только по эпидпоказаниям.



### Смывы с рук

Делают в следующей последовательности: начинают с левой руки - протирают тыльную сторону руки от кисти к пальцам, затем ладонную сторону, между пальцами и под ногтевым ложем. Этим же тампоном в такой же последовательности производят смывы с правой руки .



### Смывы с предметов обихода

При контроле больших поверхностей делают из нескольких мест. Исследуемые участки ограничивают рамкой трафарета площадью 50×50 или 100×100 см<sup>2</sup>. Трафарет изготавливают из проволоки и перед употреблением прожигают над пламенем горелки.



### Первый день исследования

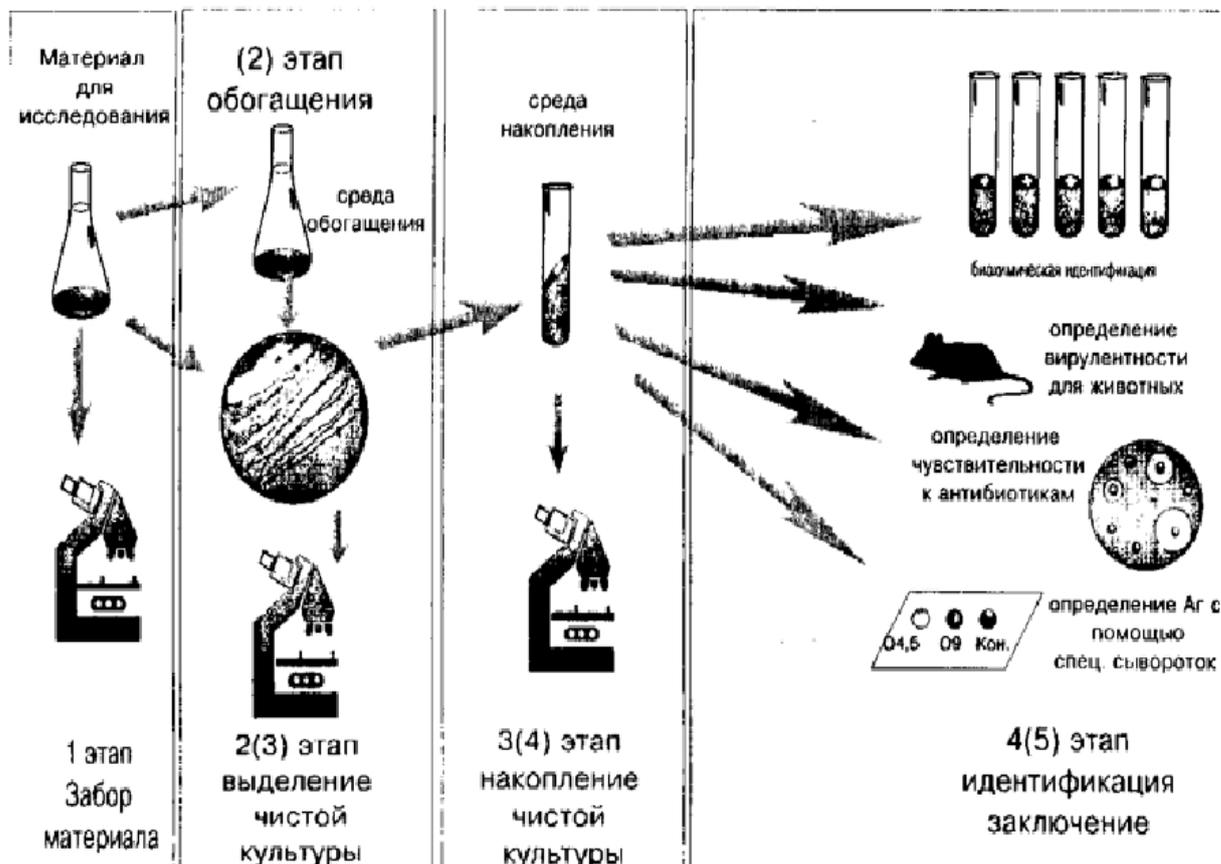
Взятые смывы засевают на среду Кода. При росте кишечной палочки среда изменяет цвет. При изменении цвета среды исследуемый материал пересевают на среду Эндо

### Второй день исследования

Изучают колонии на среде Эндо. Из подозрительных колоний делают мазки и микроскопируют.

Дальше исследование ведут по обычной схеме

### Определение общего числа бактерий



### Первый день исследования

К 2 мл взятых смывов прибавляют 8 мл изотонического раствора натрия хлорида. Получается разведение 1:5. Тампоны тщательно отмывают встряхиванием. 1 мл засевают в чашку Петри и заливают 12 мл расплавленного и остуженного до 45° С агара. Чашки инкубируют в термостате при 37° С 24

### Второй день исследования

Посевы вынимают из термостата, подсчитывают количество выросших колоний и делают пересчет на 1 см<sup>2</sup> исследуемой поверхности.

Выявление синегнойной палочки

Выявление протей.

Выявление в смывах патогенной флоры производят только по эпидпоказаниям.

## День 23

### Утилизация отработанного материала, 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 (2 ат - 132°C - 45 (индикатор Санис-1), ультрафиолетового облучения, 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. 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
2. Химические
3. Биологические (использование антибиотиков)

**Физические способы** - обработка под высокой / низкой T°C, УФ-лучами, ультразвуком:

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

**2. Воздушная стерилизация** с помощью воздушного стерилизатора ГП-80(180°C - 60 мин, 160°C – 150 мин). 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 T °C и стерилизуют установленное время. После выключают обогрев, но дверцу не открывают, пока не остынет воздух.

**3. 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.

Режимы автоклавирования:

| Показатель манометра, атм | Температура, °C | Время выдержки, мин |
|---------------------------|-----------------|---------------------|
| 0.5                       | 110             | 20/30               |
| 1                         | 121             | 15                  |
| 1                         | 121             | 30                  |

Контроль стерилизации проводят с помощью индикаторных бумаг ВИНАР. 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.

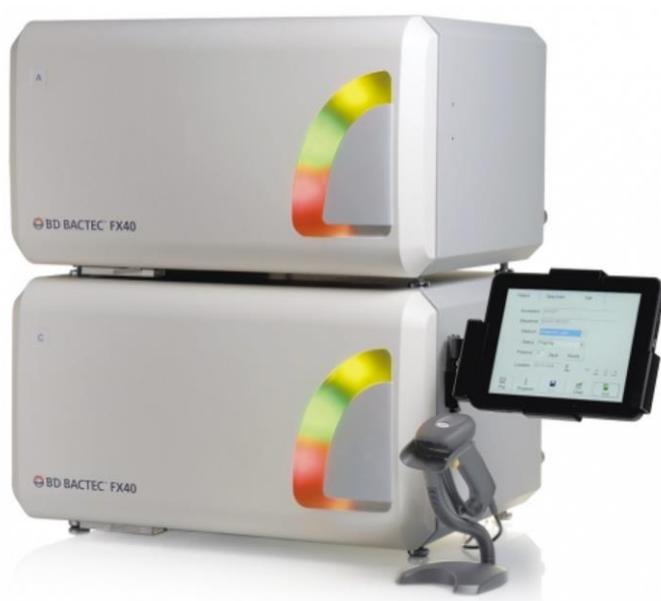
В бактериологической лаборатории утилизируют отходы класса А (неопасные отходы, не контактировавшие с больными - белый пакет или другого цвета, кроме желтого и красного) и отходы класса Б (опасные отходы с возможным инфицированием - желтый пакет). Отходы следует наполнять в пакеты не более  $\frac{3}{4}$  по объему. Контейнеры маркируют надписью класса отходов, пакеты - надписью класса отходов, наименованием медицинского учреждения, отделением, ответственным лицом и датой сбора.

Медицинские отходы в зависимости от своей эпидемиологической, радиационной опасности, а также токсичности делятся на следующие классы опасности



**День 24**  
**Дифференциальный зачет. Индивидуальное задание**  
**Метод автоматизированного культивирования крови ВАСТЕС.**

Прибор ВАСТЕС предназначен для ускоренного обнаружения бактерий и грибов в клинических образцах крови. Образцы крови отбираются у пациентов и вносятся напрямую в оригинальные флаконы с питательной средой, после чего – по возможности незамедлительно – помещаются в рабочие станции приборов серии BD Vacutec. Наличие микроорганизмов в крови устанавливается с помощью высокочувствительной флуоресцентной технологии, основанной на индикации CO<sub>2</sub>, выделяемого в питательную среду растущими и интенсивно делящимися микроорганизмами. С помощью системы BD ВАСТЕС 90 % положительных результатов выявляются в первые 24 часа инкубации, что позволяет своевременно начать эмпирическую антибактериальную терапию либо внести изменения в действующую схему лекарственной терапии. Своевременная бактериологическая диагностика бактериемии значительно сокращает частоту возникновения септического шока и увеличивает выживаемость больных.



Анализатор гемокультур ВАСТЕС FX160



Флаконы с питательными средами для анализатора гемокультур ВАСТЕС

## Технические характеристики анализатора гемокультур ВАСТЕС FX160

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Производительность             | До 40 тестов в день  |
| Единовременная вместимость     | 160 флаконов. Ее можно увеличить при подключении до трех дополнительных инкубационных модулей к контрольному модулю        |
| Назначение                     | Определение стерильности крови и других в норме стерильных биологических жидкостей, микробиологическая диагностика сепсиса |
| Тип прибора                    | Настольный   |
| Тип исследуемых образцов       | Кровь, ликвор, прочие в норме стерильные жидкости тела   |
| Загрузка флаконов              | Произвольная - свободный доступ  |
| Среднее время получения ответа | Положительный/ рост есть: 6-20 часов<br>Отрицательный/ роста нет 5 дней  |
| Типы доступных флаконов        | Флаконы с питательными средами ВАСТЕС  |

### Использование и характеристика флаконов с питательными средами ВАСТЕС

| Взятие образцов                         |   |
|---|---|
| Способ сбора образцов                   | Образцы должны забираться с соблюдением стерильности.   |
| Объем образца крови для культивирования | Составляет от 0,5 до 5,0 мл.<br>Оптимально 1,0–3,0 мл.  |
| Место сбора образцов                    | Засевать образцы во флаконы ВАСТЕС непосредственно у постели больного, используя шприц с фирменным наконечником   |
| Прекращение сбора крови                 | Когда получены необходимые 1–3 мл образца, ток крови нужно остановить — пережать трубку и извлечь комплект трубок из флакона ВАСТЕС                                   |
| Транспортировка образцов                | Засеянный флакон ВАСТЕС необходимо незамедлительно транспортировать в лабораторию. Допустимый интервал – 2 часа   |
| Пересев                                 |   |
| 1 Шаг                                   | Поместите флакон в вертикальное положение   |
| 2 Шаг                                   | Поместите спиртовой тампон на мембрану  |
| 3 Шаг                                   | Чтобы сравнять давление во флаконе, проткните мембрану, на которой помещен спиртовой тампон, стерильной иглой с соответствующим фильтром или тампоном                 |
| 4 Шаг                                   | Снимите иглу после стравливания давления и перед взятием образца для пересева. Введение и извлечение иглы должно выполняться прямолинейным движением, без скручивания |
| Состав флаконов                         |   |

| Наименование среды   | Материал                          | Назначение  | Объем, мл | Состав   |
|--|-----------------------------------|---|-----------|--|
| Среда для культивирования аэробов                            | Стеклоянный и пластиковый флаконы | Культивирования аэробов   | 8-10      | Содержит сорбент для нейтрализации антимикробных препаратов, что повышает высеваемость в случае пациента после лечения   |
| Среда для культивирования анаэробов                          | Стеклоянный и пластиковый флаконы | Среда специально создана для культивирования анаэробов (бактерий и дрожжей)   | 8-10      | Содержит сорбент для нейтрализации антимикробных препаратов, что повышает высеваемость в случае пациента после лечения   |
| Среда для культивирования аэробов из образцов детской крови  | Стеклоянный и пластиковый флаконы | Культивирование аэробов, главным образом бактерий и грибов, из образцов детской крови и других случаев малого объема образца  | 1-3       | Содержит сорбент для нейтрализации антимикробных препаратов, что повышает высеваемость в случае пациента после лечения   |
| Среда для культивирования анаэробов с лизирующим компонентом | Стеклоянный и пластиковый флаконы | Показывает меньшее время до детекции для факультативных и анаэробных микроорганизмов в сравнении с другими средами для анаэробов  | 8-10      | Содержит сапонин для лизиса лейкоцитов и высвобождения внутриклеточных микроорганизмов, что повышает высеваемость. Не содержит сорбент для инактивации антимикробных препаратов              |
| Среда для культивирования грибов, дрожжей, микобактерий      | Стеклоянный флакон                | Неселективная среда, используется как дополнительная аэробная среда для высева микобактерий, грибов и дрожжей. Эта среда может также использоваться для культивирования стерильных жидкостей организма при подозрении на грибковые инфекции. Крайне актуально | 3-5       | Содержит противомикробные препараты для подавления бактериального роста и сапонин для лизиса лейкоцитов и высвобождения внутриклеточных микроорганизмов. Не содержит сорбент для инактивации |

|  |  |   |             |                             |
|--|--|---|-------------|-----------------------------|
|  |  | использование<br>пациентов с<br>инфекцией | для<br>ВИЧ- | антимикробных<br>препаратов |
|--|--|---|-------------|-----------------------------|

При правильном заборе крови контаминация составляет не более 2-3 % всех гемокультур. Использование наборов для забора крови «BD Vacutainer» существенно снижает степень контаминированности культур.

При наличии роста микроорганизма во флаконе анализатор оповещает персонал лаборатории с помощью световой индикации на передней панели прибора, а также с помощью звуковой индикации. Таким образом, нет необходимости делать высевы из всех флаконов, высев делается целенаправленно из положительного флакона.[15] (Приложение Г, таблица Г1)



# ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ (ПРЕДДИПЛОМНОЙ) ПРАКТИКЕ

Видяйкиной Евгении Николаевны  
Ф.И.О. обучающегося

Группы 407 специальности Лабораторная диагностика

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

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   |            |

