

День 1

15.04.2019

В первый день прохождения производственной практики я ознакомилась со структурой бактериологического отдела КДЛ КГБУЗ «КККОД им. А.И.Крыжановского» и прошла инструктаж по правилам безопасного проведения работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности в бактериологическом отделе.

Так же ознакомилась с документами на основании которых ведутся работы в бактериологическом отделе КДЛ:

1. Инструкция(№32) по охране труда для персонала клинко-диагностической лаборатории;
2. Инструкция (№ 003) БО Порядок действий по безопасной ликвидации аварий при работе с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности (опасности) в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории;
3. Инструкция (№ 004) По соблюдению санитарно-эпидемиологических требований к обращению с медицинскими отходами в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории;
4. Должностной инструкцией младшего медицинского персонала осуществляющего сбор, хранение, транспортировку медицинских отходов;
5. Инструкцией (№001БО) по правилам соблюдения противэпидемического режима (режима биологической безопасности) в бактериологическом отделе клинко-диагностической лаборатории;
6. Постановление (№86) о безопасности работы с микроорганизмами 3-4 группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней;
7. Инструкцией (№17) по охране труда при выполнении работ с кровью и другими биологическими жидкостями пациентов.

После прохождения инструктажа мы расписались в журналах регистрации «Инструктажа на рабочем месте по охране труда» и журнале регистрации «Инструктажа на рабочем месте по пожарной безопасности».

Затем была проведена экскурсия по бактериологической лаборатории.

Краткая характеристика объекта.

Бактериологический отдел КДЛ является структурным подразделением клинико-диагностической лаборатории КГБУЗ «Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И.Крыжановского» и располагается по адресу г. Красноярск, ул. 1-ая Смоленская, дом 16, строение 7, на 2 этаже лечебно-диагностического корпуса (корпус I).

Отдел представляет блок помещений, изолированный от прочих подразделений запирающимися дверьми. Дополнительно на дверях рабочих кабинетов установлены электронные замки с устройством доступа по персональным электронным картам. Полезная площадь лаборатории 541,2 кв.м. На входной двери обозначены название отдела и международный знак «Биологическая опасность».

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

Помещения отдела разделяют на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с патогенными биологическими агентами (далее ПБА) и их хранение, и «чистую», где не проводят работы с микроорганизмами и их хранение.

Коридор «чистой» и «заразной» зоны разделен дверьми (система шлюза), перемещение персонала из зоны в зону осуществляется через санитарно - пропускную зону.

Основными видами деятельности бактериологического отдела КДЛ согласно установленного перечня номенклатуры исследований являются:

- Исследование клинического материала от больных по профилю неинфекционного стационара;
- Санитарно-микробиологические исследования в рамках программы производственного и внутрилабораторного контроля.

Основная деятельность бактериологического отдела связана с работой с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)!

Все исследования в Бактериологическом отделе КДЛ подлежат фиксации в соответствующих журналах регистрационных и рабочих журналах.

Сведения о помещениях бактериологического отдела КДЛ

№	Наименование помещения	Назначение помещения
1	2	3
223	Склад	Хранение питательных сред, реагентов
224	Ординаторская	Работа с документами
225	Административное помещение	Работа с документами
226	Комната персонала	Прием пищи, отдых
227	Склад	Хранение расходных материалов, посуды лабораторной
	Помещение хранения уборочного инвентаря	Хранение уборочного инвентаря помещений «чистой» зоны
228	Гардероб личной одежды с душем и туалетом	Хранение личной одежды персонала, надевание рабочей одежды
229/1	Подготовка питательных сред	Варка сред, расплавление агаризованных питательных сред,
229/2	Предбокс	Переодевание перед входом в бокс
229/3	Стерилизационная	Стерилизация лабораторной посуды
229/4	Бокс для розлива стерильных питательных сред	Асептический розлив питательных сред
230	Помещение для хранения готовых БПС во флаконах.	Хранение питательных сред и диагностических препаратов
231	Приготовление питательных сред	Приготовление питательных сред

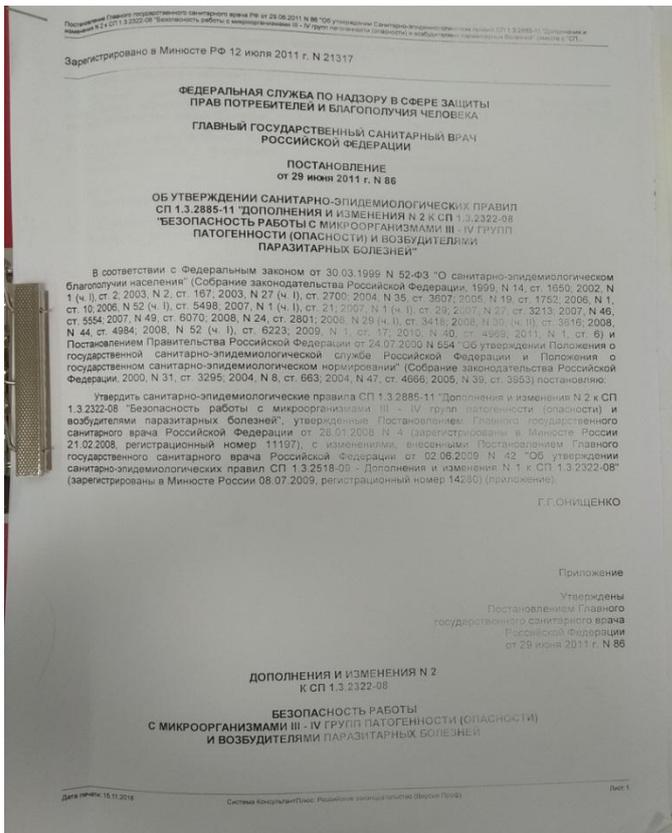
232	Стерилизационная (Чистая автоклавная)	Стерилизация питательных сред и лабораторной посуды
233	Моечная	Мытье и предстерилизационная подготовка лабораторной посуды
234	Помещение для хранения готовых питательных сред, находящихся на карантинизации	Хранение БПС (которые прошли проверку на стерильность и чистоту розлива)
	Санпропускник персонала (чистая зона)	Смена рабочей одежды
	Санпропускник персонала (заразная зона) с санитарным душем	Смена рабочей одежды на специальную для «заразной зоны». Надевание СИЗ. Санитарный душ (для аварийных ситуаций)
235	Помещение для обеззараживания («убивочная автоклавная»)	Обеззараживание ПБА (патогенных биологических агентов) и бактериологических посевов паром под давлением
236	Бокс для посева на стерильность	Посев стерильного материала
237	Предбокс	Переодевание перед входом в бокс
238	Аппаратная	Микроскопия. Центрифугирование.
239	Электрофорезная	Учет результатов электрофоретической детекции продуктов амплификации НК
240	Помещение для хранения уборочного инвентаря и приготовления дезинфицирующих средств	Хранение уборочного инвентаря помещений «заразной» зоны, приготовление дезинфицирующих растворов
241	Материальная	Хранение расходных материалов
242	Санитарно-бактериологические	Просмотр посевов санитарных исследований, пересевы, отсеб

	исследования	колоний, постановка идентификационных тестов, учет результатов.
243	Исследование гематологических культур	Работа с музейными культурами. Инкубация посевов крови.
244	Исследование отделяемого ДП	Посев биологического материала, инкубация посевов, просмотр посевов, откол колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов
245	Клинико-бактериологические исследования	Посев биологического материала, инкубация посевов, просмотр посевов, откол изолированных колоний, постановка идентификационных тестов, определение чувствительности к антибиотикам, учет результатов, Приготовление и окраска мазков, микроскопия мазков
246	Бактериологические/Иммунологические исследования.	Иммунологические исследования
247	Выделение нуклеиновых кислот	Выделение и очистка нуклеиновых кислот
253	Прием и регистрация проб, выдача результатов	Прием проб биологического материала, маркировка для бактериологического и молекулярно-генетического исследования
248	Приготовление реакционных смесей и внесение ДНК	

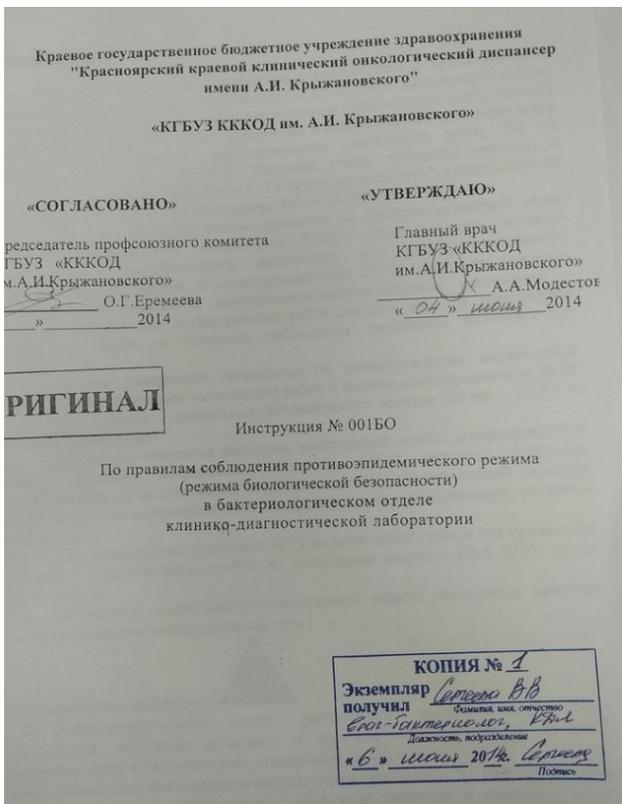
249	ПЦР в режиме реального времени	Амплификация нуклеиновых кислот и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени
250	Секвенаторная	Амплификация и секвенирование нуклеиновых кислот
251	Обработка результатов	Обработка полученных данных
252	Кладовая (низкотемпературный холодильник)	Хранение наборов реагентов для ПЦР анализа

Все исследования в Бактериологическом отделе КДЛ подлежат фиксации в соответствующих журналах регистрации:

- Журнал контроля чистоты розлива (стерильности) питательных сред;
- Журнал приготовления питательных сред;
- Рабочий журнал микробиологических исследований смывов с объектов внешней (окружающей) среды в режимных помещениях на обнаружение БГКП, НГБО и *S. aureus*;
- Рабочий журнал микробиологических испытаний смывов с объектов внешней среды на БГКП;
- Рабочий журнал клинических микробиологических исследований;
- Журнал микроскопий;
- -Рабочий журнал Определения чувствительности микроорганизмов рода *Staphylococcus* и рода *Enterococcus* к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом;
- Рабочий журнал Определения чувствительности микроорганизмов группы *Acinetobacter* к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом;
- Рабочий журнал определения чувствительности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом;



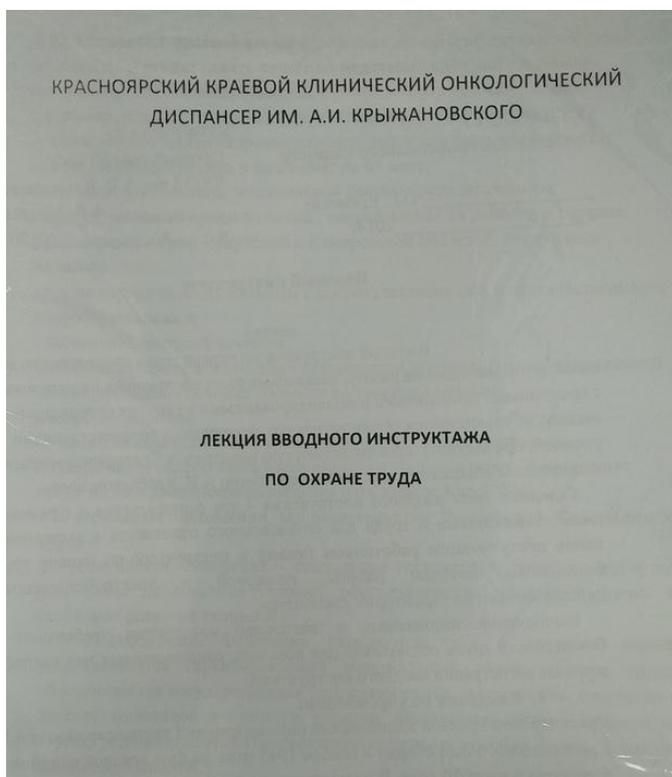
Постановление (№86) о безопасности работы с микроорганизмами 3-4 группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.



Инструкция (№001BO) по правилам соблюдения противоэпидемического режима (режима биологической безопасности) в бактериологическом отделе клинико-диагностической лаборатории.



Журнал регистрации
«Инструктажа на рабочем
месте по пожарной
безопасности».



Лекция вводного
инструктажа по охране
труда.

День 2

16.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Сегодня я проводила санитарно-эпидемиологическую обработку помещений бактериологической лаборатории, т. е. проведение дезинфекции рабочих кабинетов.

При обработке помещений используются такие дезинфицирующие средства как «3D-Септ» и «Приоль», я ознакомилась с инструкциями по их разведению для различных помещений и поверхностей.

Дезинфекция стен, поверхности столов и оборудования производилась дезинфицирующим средством с моющим эффектом «3D-СЕПТ». Разведение производится в соответствии с таблицей разведения дезинфицирующего средства.

Таблица 1. Приготовление рабочих растворов средства «3D-Септ»

Концентрация рабочего раствора (%) по:		Количество ингредиентов (мл), необходимое для приготовления:			
Препарату	Сумме ЧАС	1 л рабочего раствора		10 л рабочего раствора	
		концентрат	Вода	концентрат	вода
0,05	0,00523	0,5	999,5	10	9995
0,1	0,0105	1	999	10	9990
0,2	0,0210	2	998	20	9980
0,25	0,0263	2,5	997,5	25	9975
0,4	0,0420	4	996	40	9960
0,5	0,0525	5	995	50	9950
0,8	0,0840	8	992	80	9920
1,0	0,1050	10	990	100	9900
1,5	0,1575	15	985	150	9850
2,0	0,2100	20	980	200	9800
2,5	0,2625	25	975	250	9750
3,0	0,3150	30	970	300	9700
4,0	0,4200	40	960	400	9600
5,0	0,5250	50	950	500	9500



В целях профилактики внутрибольничных инфекций (далее - ВБИ) в лечебно-профилактической организации осуществляются дезинфекционные и стерилизационные мероприятия, которые включают в себя работы по профилактической и очаговой дезинфекции, обеззараживанию, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

Для проведения дезинфекционных и стерилизационных мероприятий ООМД (организация, осуществляющая медицинскую деятельность) должны регулярно обеспечиваться моющими и дезинфицирующими средствами различного назначения, кожными антисептиками, средствами для стерилизации изделий медицинского назначения, а также стерилизационными упаковочными материалами и средствами контроля (в том числе химическими индикаторами).

Дезинфекция – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение определенного вида патогенного или условно-патогенного микроорганизма в объектах внешней среды с помощью химических антисептиков, физических, биологических воздействий.

В микробиологической лаборатории используют два метода дезинфекции:

1. Химический: основан на применении разнообразных химических веществ, вызывающих гибель микроорганизмов. Его используют с целью обеззараживания различных объектов внешней среды, воздуха, биологических субстратов. При работе в микробиологической лаборатории допускаются дез. растворы, разрешенные к применению на территории РФ.

2.Физический метод: обеспечивает удаление микроорганизмов с объектов путем воздействия физических факторов: высокой температуры горячего воздуха, пара под давлением, ультрафиолетовых лучей.

Контроль стерильности в автоклаве – для проверки стерильности материала и работы автоклава используют химические индикаторы. При объёме автоклава до 100 литров используют 5 индикаторов, если объём автоклава больше 100 литров используют 11 индикаторов. Закладки производятся при каждом цикле.

День 3

17.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Работа в отделе санитарно-бактериологических исследований:

1) Я ознакомилась с правилами отбора проб воздуха в лаборатории при помощи Аспиратора ПУ – 1Б, прибор предназначен для автоматического отбора проб биологических аэрозолей воздуха при проведении санитарного контроля воздуха различных помещений в больницах, поликлиниках, ЛПУ.

Подготовка к работе и порядок работы ПУ-1Б:

Подготавливают чашки Петри в соответствии с утвержденной в установленном порядке методикой (в стандартную стеклянную чашку Петри заливается 20-21 мл питательной среды). При этом поверхность агара будет находиться в 3мм от нижней плоскости многосопловой решетки.

Снимают верхнюю часть корпуса пробоотборника и защитную крышку. Устанавливают чашку с питательной средой в держатели пробоотборника. Включают блок питания в сеть 220В, 50Гц и включить тумблер питания (при использовании аспиратора ПУ-1Б исп.1 со встроенным аккумулятором можно включить прибор только тумблером). Устанавливают соответствующий объем отбираемой пробы (100 или 250л). Нажимают кнопку "Пуск". После отбора пробы снимают чашку Петри, закрывают ее крышкой и помещают в термостат для образования колоний.

Отбор проб:

Отбор проб происходит на плотные питательные среды тиогликолевая (обнаружение общего микробного числа), ЖСА – среда для выделения стафилококков, содержит до 10% хлорида натрия, что подавляет большинство бактерий, содержащихся в материале. Кроме того, эта среда является и дифференциально-диагностической, так как присутствие яичного желтка позволяет выявить фермент лецитиназу (лецитовителлазу), который образуют патогенные стафилококки. Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфорхолины и нерастворимые в воде жирные кислоты, поэтому среда вокруг лецитиназоположительных колоний мутнеет и появляется опалесцирующая зона в виде «радужного венчика», среда Сабуро (питательная среда предназначена для выращивания и подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов).

2) Ознакомилась с правилами отбора смывов с объектов внешней среды и провела их учёт. Бактериологическое исследование смывов с внешней среды предусматривает определение БГКП, НГОБ и *S.aureus*, их обнаружение расценивается как одно из подтверждений нарушения санитарного режима. Отбор проб с поверхности различных объектов осуществляется методом смыва. Взятие смывов производится с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Для обнаружения стафилококков делают высеивание смывной жидкости в пробирку солевого бульона. Инкубируют при температуре + 37°C в течении 18-24 часов. Определяют на глаз мутность, после чего делают пересев на ЖСА и среду Эндо.

Учёт и запись результатов микробиологических исследований смывов с объектов внешней окружающей среды в режимных помещениях на обнаружение БГКП, НГОБ и *S.aureus* (посевы сделаны на МПБ). Все результаты-отрицательные.



3) Просматривала бактериологическое исследование инструментария, перевязочного, шовного и другого хирургического материала на стерильность. Проводят согласно методическим указаниям «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях», МУК 4.2.2942-11. Посевы исследуемого материала делают в боксе с соблюдением правил асептики. Исследуемый материал вносят в две пробирки с тиогликолевой средой и две пробирки с бульоном Сабуро. Посевы в тиогликолевой среде инкубируют при 30-35°C, а в среде Сабуро — при 20—25°C.

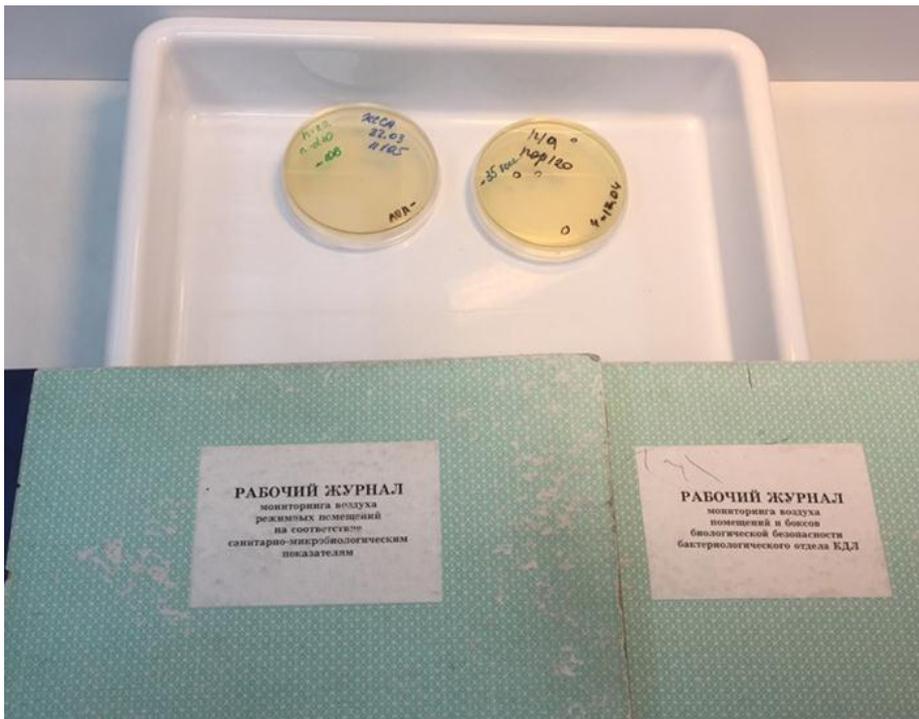
Посевы выдерживают в термостате в течение 7 суток при паровой стерилизации и 14 суток при стерилизации химическим способом, просматривая их каждый день и делая записи о наличии роста ежедневно. При появлении роста микробов делают мазок, окрашивают по Граму, микроскопируют. Дальнейший ход исследования зависит от вида микроорганизма. Материал считается стерильным при отсутствии роста во всех пробирках.

Учёт и запись результатов микробиологических испытаний хирургического инструментария и перевязочного материала по показателю «СТЕРИЛЬНОСТЬ». Все результаты - отрицательные.



4) Я проводила учёт результатов мониторинга воздуха режимных помещений на соответствие санитарно-микробиологических показателей, учёт результатов мониторинга воздуха помещений и боксов биологической безопасности бактериологического отдела КДЛ на средах ЖСА и питательном агаре. Анализ пробы производится путем визуального подсчета колоний микроорганизмов на поверхности агара, количество которых соответствует числу частиц, содержащих живые микроорганизмы (колониеобразующие единицы, КОЕ) в отобранном объеме воздуха.

Просмотр наличия ЛВА и ведём подсчет колоний (кол-во КОЕ, ЛВА+/-)



Все результаты фиксируются в специальные журналы.

Дата	№ п/п	Подразделение, Цель: план/эпид	Наименование объекта	Среда накопления МПБ/РПБ/пептонная вода		Среда на энтеробиотический Эпид
				дата	характер роста	
16.04	716	К 208 эквн.	Кухня	17.04	нет	
	717		Исследования		нет	
	718		Исследования		нет	
	719		Исследования		нет	
	720		Исследования		нет	
	721	К 210 эквн.	Кухня		нет	
	722		Исследования		нет	
	723		Исследования		нет	
	724		Исследования		нет	
	725		Исследования		нет	
	726	К 211 эквн.	Исследования		нет	
	727		Исследования		нет	
	728		Исследования		нет	
	729		Исследования		нет	
	730	К 215 эквн.	Исследования		нет	
	731		Исследования		нет	
	732		Исследования		нет	
	733		Исследования		нет	
	734		Исследования		нет	
	735		Исследования		нет	

В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

После проведения регистрации проб, я сделала посевы доставленного в лабораторию биоматериала отделяемого дренажа сигмовидной кишки из брюшной полости (отбор материала производился 16.04.19) на набор плотных питательных сред (Кровяной агар, Среда Эндо, Желточно-солевой агар (ЖСА), Энтерококк агар, Сабуро агар и Кандида агар) и убрала их в термостат. Тампон с биоматериалом поместила в среду обогащения.

33
 ККОД им. А.И.Крыжановского
 К.Л. Бактериологический отдел

1
 Медицинская документация
 Форма N 204/У
 Утверждена Минздравом СССР
 04.10.80 N 1030

Петрова А

Направление
 на микробиологическое исследование

Отбор "16" 04 2019 г. 14 час 00 мин

Ф.И.О. Кенгуров Виктор Серафимович

Дата рождения 17.12.1960 г. Отделение ОКП

Диагноз для обследования, дата заболевания: ЖХО сепсисов феморали

Показания к обследованию: больной, переболевший, реконвалесцент, профилактическое обследование
 (нужное подчеркнуть)

Материал: кровь, мокрота, промывные воды бронхов, раневое отделяемое*, отделяемое дренажа*, моча, пунктат*, кал, соскоб, гной,
 (нужное подчеркнуть, вписать)

Локализация: *брюшная полость, плевральная полость, мягкие ткани,
 (нужное подчеркнуть, вписать)

Цель и наименование исследования: бак посева в 5 сред
 (для карантинных инфекций - на какие инфекции исследовать)

Ф.И.О. и должность лица, направляющего материал: Кенгуров Виктор Серафимович

Подпись лица, направляющего материал: Кенгуров Виктор Серафимович

Принцип посева клинического материала:

Посевы любого клинического материала от хирургических больных осуществляется по методу Gould на 5 питательных средах:

- 1) Кровяной агар – получают путем добавления к питательной среде 5–10% стерильной дефибринированной крови барана, кролика лошади, человека. Среда используется для выделения стрептококков, пневмококков и других бактерий, а также для изучения гемолитической активности.
- 2) Среда Эндо – дифференциальная среда для выделения энтеробактерий и способности использовать лактозу;
- 3) Желточно-солевой агар (ЖСА) – среда для выделения стафилококков, содержит до 10% хлорида натрия, что подавляет большинство бактерий, содержащихся в материале. Кроме того, эта среда является и дифференциально-диагностической, так как присутствие яичного желтка позволяет выявить фермент лецитиназу (лецитовителлазу), который образуют патогенные стафилококки. Лецитиназа расщепляет лецитин на фосфорхолины и нерастворимые в воде жирные кислоты, поэтому среда вокруг лецитиназоположительных колоний мутнеет и появляется опалесцирующая зона в виде «радужного венчика».

4) Энтерококк агар – питательная среда предназначена для выделения энтерококков из клинического материала (фекальных масс, мочи, мокроты и др.), воды, пищевых продуктов и других объектов.

5) Сабуро-агар – питательная среда предназначена для выращивания и подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов, даёт бесцветный рост.

6) Кандида-агар (хромогенный) – питательная среда для выявления и идентификации гриба *Candida*, состоящий из глюкозы, а/б хлорамфеникола, бактериологического агара, пептона и хромогенной смеси.

Микроорганизмы	Рост	Цвет колоний
<i>Candida tropicalis</i>	АТТС/369	Синий
<i>Candida albicans</i>	АТТС 10231	Зелёный
<i>Candida krusei</i>	АТТС 34133	Фиолетово-розовый
<i>Candida parapsilosis</i>	АТТС 22019	Бледно-фиолетовый
<i>Candida glabrata</i>	АТТС 2001	Бледно-фиолетовый



Метод секторных посевов Gould

Бактериологической петлей диаметром 3 мм произвести посев (30-40 штрихов) исследуемого материала на 1-й сектор чашек Петри с питательными средами. После этого петлю прожечь и произвести 4-5 штриховых посева из 1-го сектора по 2-й, аналогичным образом из 2-го сектора в 3-й, и из 3-го в 4-й, прожигая петлю после пересева с каждого сектора. Чашки инкубировать в термостате при 37°C в течение 18-24 часов.



Подсчёт колоний:

Таблица 1

А	Количество колоний в секторах			Количество бактерий в 1 мл
	I	II	III	
1-6	-	-	-	менее 1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
не сосч.	20-30	-	-	500000
"	40-60	-	-	1 млн.
"	100-140	10-20	-	5 млн.
"	не сосч.	30-40	-	10 млн.
"	"	60-80	колонии един.	100 млн.

В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

День 4

18.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

На второй день, после того как бактериологические посевы простояли сутки в термостате, просматриваем культуры на чашках Петри. Подозрительные колонии высевают на среду накопления, для выращивания чистой культуры.

Затем получила задание промикроскопировать колонии, поставить антибиограмму и биохимические тесты.

Перед постановкой биохимических тестов на определение идентификации неизвестных бактерий, из холодильника берём среды Пешкова, Хью-Лейфсона, среду с маннитом, среду Симонса и среду Олькеницкого. Делаем посев в столбики агара уколом и площадкой. Затем ставим в термостат на 24ч при температуре 37 градусов.

В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности

После постановки биохимических тестов я провожу микроскопию выделенных колоний:

Приготовление мазков и их фиксация

Приготовление окрашенного препарата состоит из следующих этапов:

- 1) приготовление мазков;
 - 2) высушивание мазка;
 - 3) фиксация мазка;
- окраска мазка.

Для приготовления препарата, на обезжиренное предметное стекло, наносят каплю воды или физиологического раствора, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют тонким равномерным слоем по стеклу на площади приблизительно 1 см². Если исследуемый материал находится в жидкой среде, то его непосредственно наносят петлей на предметное стекло и готовят мазок. Мазки высушивают на воздухе. Для фиксации мазка предметное стекло (мазком вверх) медленно проводят 3-4 раза через пламя спиртовки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляются к поверхности стекла и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур.

После фиксации я окрашиваю мазки по Граму с помощью набора «Микро-Грам-НИЦФ»



Комплект реагентов Микро-ГРАМ-НИЦФ предназначен для дифференциально-диагностической окраски микроорганизмов путем последовательной обработки мазка, взятого из биологического материала человека (гной, мокрота, моча и др.), компонентами комплекта. Один комплект рассчитан на проведение окраски 100 мазков.

Комплект реагентов Микро-ГРАМ-НИЦФ:

- генциановый фиолетовый карболовый, готов к применению —1 флакон (100 мл.)
- фуксин основной карболовый концентрированный—1 флакон (10 мл.)
- раствор Люголя, готов к применению— 1 флакон (100 мл)

Приготовление рабочего раствора фуксина

Внести в пробирку вместимостью 15 мл 1,0 мл фуксина основного карболового концентрированного (раствор фуксина ЦИЛЯ), добавить 9,0 мл дистиллированной воды и перемешать.

Полученный рабочий раствор фуксина (раствор фуксина Пфейфера) можно хранить при комнатной температуре(+18 -25°C) не более 24ч.

Условия хранения и эксплуатации Комплект реагентов Микро-ГРАМ-НИЦФ

Срок годности фуксина Циля — 12 мес, генцианвиолета — 12 мес, раствора Люголя -6 мес. Рабочий раствор фуксина основного (раствор фуксина Пфейфера) можно хранить при комнатной температуре не более 24 ч. После вскрытия флакона генциановый фиолетовый и раствор Люголя можно хранить при комнатной температуре не более 6 мес. Фуксин основной концентрированный (раствор фуксина Циля) после вскрытия флакона можно хранить при комнатной температуре в течение всего срока годности (12 месяцев).

Проведение окраски:

На фиксированный мазок наложить кусочек фильтровальной бумаги, на который налить избыток генцианового фиолетового карболового и выдержать при комнатной температуре (+18 -25°C) в течение 1 — 2 мин.

Снять бумагу, слить краску и, не промывая мазок водой, налить на мазок 0,7 — 1,0 мл раствора Люголя и выдержать мазок при комнатной температуре в течение 1 — 2 мин.

Слить раствор Люголя и, не промывая, погрузить стекло с мазком в стакан со спиртом этиловым 96%, покачивая стекло до тех пор, пока с мазка не перестанут отходить струйки краски (не более 30 сек).

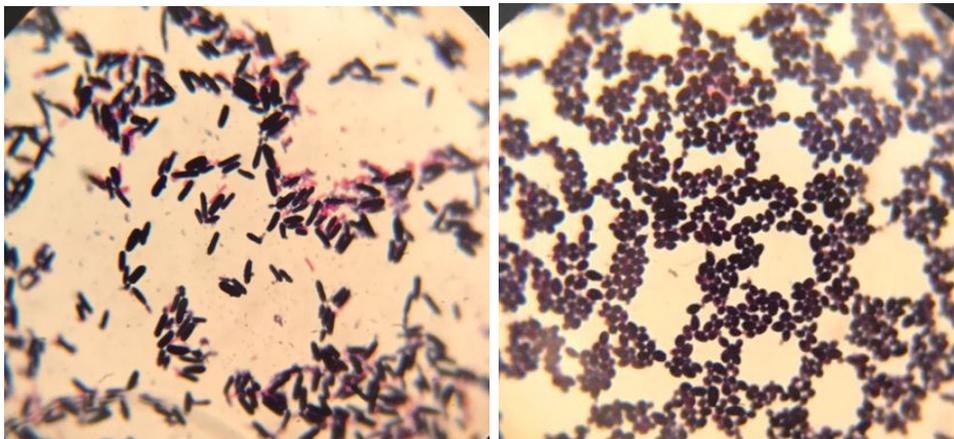
Извлечь стекло с мазком из спирта, ополоснуть мазок дистиллированной водой, залить поверхность мазка раствором фуксина Пфейфера и выдержать мазок при комнатной температуре в течение 30 — 60 сек.

Слить краску со стекла, промыть мазок дистиллированной водой, высушить стекло с помощью фильтровальной бумаги или естественной сушкой в наклонном положении при комнатной температуре и провести микроскопию с использованием иммерсионной системы при увеличении X (900 — 1000).

Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый или фиолетовый с синим оттенком цвет, грамотрицательные микроорганизмы — в красный цвет.

Результат окраски:

При микроскопии были обнаружены кокки грам «-», дрожжеподобные грибы и грам «-» палочки.



В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

Постановки антибиограммы диско-диффузионным (ДДМ) методом:

Принцип метода:

Метод определения чувствительности основан на способности АБП проникать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Диски с антибиотиками:

Для определения чувствительности ДДМ следует использовать только стандартизированные качественные диски.

Небольшие партии дисков, используемые при повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре + 4 - + 8°C, плотно закупоренными так, чтобы гарантировать невозможность попадания во флакон влаги.

Приготовление микробной взвеси:

При определении чувствительности ДДМ используют стандартную суспензию живых микроорганизмов, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Её следует использовать в течение 15 минут после приготовления. Для засеваания приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

- Наиболее удобным способом засеваания является использование коммерческих стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток микробной взвеси

удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Засевание проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°.

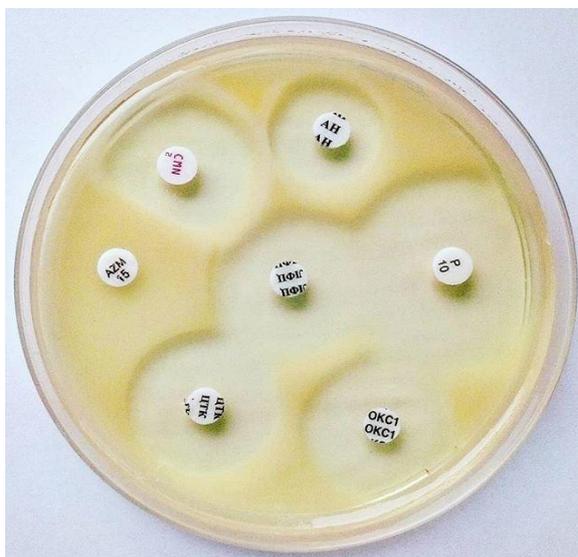
- При использовании второго способа стандартную взвесь наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 - 2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток жидкости пипеткой.

Аппликация дисков и инкубация:

Не позднее, чем через 15 мин. после засевания на поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или **автоматического диспенсера**. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15 - 20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с АБП.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18 - 24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма).

Учёт результатов производят на следующий день после инкубирования.



В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

Применение набора реагентов «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ)»

Состав набора:

ПБДЭ-пластина с 20 конусообразными лунками, содержащими сухие питательные субстраты с индикаторами, позволяет определить следующие биохимические свойства культур энтеробактерий: утилизацию цитрата натрия, как в присутствии сахара (модификация цитратной среды Христенсена), так и без него (модификация цитратной среды Симонса), малоната натрия, глюкозы, лактозы, маннита, сахарозы, инозита, сорбита, арабинозы, мальтозы, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра), наличие уреазы, бетта-галактозидазы, декарбоксилазы орнитина и лизина, дегидролазы аргинина, дезаминазы фенилаланина.

Дополнительные реагенты для учёта результатов анализа:

1. Железа (3) хлорид гексагидрат;
2. Пара-диметиламинобензальдегид;
3. Альфа-нафтол;
4. Калия гидроксид;
5. Фосфатно-солевой буферный раствор, сухой ФБР-натрия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, натрия хлорид;
6. Масло вазелиновое.

Набор рассчитан на дифференциацию до вида 20 культур микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выделенных в ходе бактериологического анализа.

Способ применения:

Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки анализа:

1. Термостат
2. Дозаторы, пипеточные переменного объема (одно- и многоканальные) с одноразовыми наконечниками
3. Стерильный фосфатно-буферный раствор (ФБР) pH от 6,0 до 6,2
4. Пипетки вместимостью 1 мл
5. Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности) (ОСО42-28-85-06п)-10 ме.
6. Пробирки стеклянные стерильные

Подготовка исследуемых образцов:

Для идентификации культуры энтеробактерий выращивают на питательном агаре или на средах для первичной дифференциации (среда Клиглера, Олькеницкого и др.) в течении 18-24 часов при температуре 37°С.

Ход анализа:

1. Извлекают пластину из полиэтиленового пакета;
2. Регистрируют на крышке пластины номер засеваемого штамма;
3. Открывают крышку пластины и располагают пластину на столе;
4. Добавляют пипеткой вместимостью 1,0мл по 0,15 мл микробной суспензии во все лунки пластины;
5. Для создания анаэробных условий наслаивают по 1-2 капли стерильного вазелинового масла в лунки для определения лизиндекарбоксилазы(№4), аргининдегидролазы(№5), орнитиндекарбоксилазы(№6), уреазы(№10), и образования сероводорода(№11) закрывают пластину крышкой;
6. Выдерживают пластину при температуре 37 градусов от 18-24 часов.

Учёт результатов проводят после инкубирования.

Обеззараживание:

Использованную пластину обеззараживают погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства (СМС) или в 3% раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации не менее 1 часа.

Срок годности. Условия хранения и транспортировки:

Срок годности набора-12 мес.

По истечению срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 25 °С. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищённом от света месте.

В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

День 5

19.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Я провела учёт биохимических тестов после 24 часов инкубирования, учёт антибиограммы и ПБДЭ.

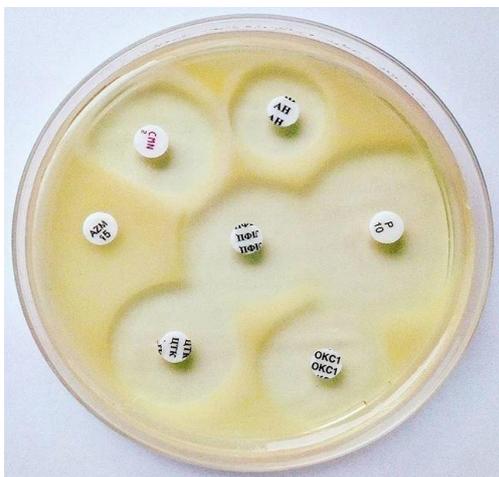
Учёт биохимических тестов:

1. Среде Олькеницкого: H₂S (-), OF_{Гл} (+), OF_{Лак} (+), образовался газ.
2. Среда Хью-Лейфсона: цитрат (+), окс (+).
3. Среда Пешкова: видна подвижность.
4. Среда Симонса: (-).



Учет результатов антибиограммы:

Действие антибиотиков оценивают по феномену задержки роста вокруг диска. Диаметр зон задержки роста микробов вокруг дисков определяют с помощью линейки, включая диаметр самого диска.



В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

Учёт результатов ПБДЭ:

Учёт результатов производят визуально в соответствии с цветовым указателем, по окончании инкубации при температуре 37°C. Учёт результатов теста на обнаружение бетта-галактозидазы проводят дважды: через 3-5 часов и через 18-24 часа, так как у некоторых штаммов лимонно-жёлтое окрашивание через 18-24 ч исчезает.

После окончания инкубации открывают крышку пластины и в лунку для выявления фенилаланиндезаминазы (№7) добавляют 1 каплю 10% раствора железа(3) хлорида, в лунку для определения ацетилметилкарбинола (№9)-1 каплю 6% раствора альфа-нафтола и 1 каплю-40% раствора гидроксида калия, в лунку для выявления индола (№8) -1-3 капли реактива Эрлиха.

Выявление ацетилметилкарбинола (№9) осуществляется через 15-20 минут после закапывания реактивов.

Идентификацию культур микроорганизмов проводят с использованием таблицы биохимических свойств энтеробактерий ,диагностического ключа ,кодовой карточки ,каталога кодов-пособия интерпретации результатов идентификации с использованием математического метода классификации.

Цветовой указатель

№ Лунки и Теста	Наименование теста	Цвет среды в сухом виде	Цвет среды в растворённом виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	Утилизация цитрата натрия	Жёлтый, светло-жёлтый	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
2	Утилизация малоната натрия	Жёлтый	Жёлтый	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
3	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	Жёлтый, коричневый	Жёлтый, коричневый	Фиолетовый, бурый	Жёлтый, коричневый
4	Наличие лизиндекарбоксилазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
5	Наличие аргининдегидролазы	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный
6	Утилизация орнитиндека	Жёлтый, светло-зелёный	Жёлтый, светло-зелёный	Тёмно-зелёный, синий	Жёлтый, светло-зелёный

	рбоксилазы				
7	Наличие фенилаланин дезаминазы	Бесцветный	Бесцветный	Тёмно-зелёный	Жёлтый
8	Образование индола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый	Бесцветный
9	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый, малиновый	Бесцветный
10	Наличие уреазы	Жёлтый	Жёлтый	Малиновый, красный	Жёлтый
11	Образование сероводорода	Бесцветный	Бесцветный	Чёрный, тёмно-серый, коричневый.	Жёлтый
12	Утилизация глюкозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
13	Наличие бета-галактозидазы	Бесцветный	Бесцветный	Жёлтый	Бесцветный
14	Утилизация лактозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
15	Утилизация маннита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
16	Утилизация сахарозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
17	Утилизация иннозита	Красный	Красный	Жёлтый	Красный
18	Утилизация сорбита	Красный	Красный	Жёлтый, жёлто-оранжевый	Красный
19	Утилизация арабинозы	Красный	Красный	Жёлтый, жёлто-оранжевый	Красный
20	Утилизация мальтозы	Красный	Красный	Жёлтый	Красный

В конце исследований произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

День 6

22.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Сегодня я производила маркировку питательных сред. Маркировка производится с указанием названия среды, номера партии и даты изготовления. После маркировки питательных сред они помещаются в специально отведённые помещения с холодильниками для дальнейшего их использования по назначению.

Затем я ознакомилась с правилами приготовления питательных сред:

К питательным средам предъявляются следующие требования: должны содержать все необходимые вещества для питания микробов, иметь определенную реакцию среды, быть стерильными и обязательно влажными, бактериологические питательные среды (БПС). Среда коммерческого производства должны храниться с соблюдением требованием температуры воздуха в упаковке производителя. На упаковке обязательно указан срок годности питательной среды, применение с истекшим сроком годности запрещен.

Этапы приготовления:

1. Берется навеска сухой основы (из расчета кол-во в граммах указанного на литр) .Взвесила навеску

2. В металлическую емкость сыпала навеску и добавила нужное кол-во дистиллированной воды

3. Нагрела на электроплите, размешивая (варила до закипания и растворения)

4. Разливают в посуду (флаконы, пробирки, чашки)

5. Среда, которые подлежат стерилизации, отправляют в стерилизационную в паровой стерилизатор, закладывая индикаторы с соответствующим режимом

6. После стерилизации проводится маркировка ёмкостей.

Факт стерилизации питательных сред фиксируется в журнале контроля работы стерилизаторов воздушного, парового (автоклава), с вклеиванием индикаторов.



Контроль стерильности питательных сред:

Для контроля стерильности питательных сред, после изготовления и стерилизации помещают в термостат при температуре $+36,0 \pm 1,0$ (термостатическая проба)

Факт контроля стерильности питательных сред фиксируется в журнале контроля чистоты розлива (стерильности) БПС.

Готовые питательные среды хранятся в холодильнике от $+2$ до $+8$ градуса. Условия хранения в холодильнике фиксируются в журнале учета работы холодильника

Так же я ознакомилась с инструкцией по загрузке питательных сред для стерилизации в паровой автоматический стерилизатор (СПВА-74-1-НН)

Область применения:

- Стерилизация в автоклаве медицинских изделий из твердых материалов - металлические хирургические инструменты, стеклянная посуда для лабораторий и др.
- Стерилизация изделий из пористых и полых материалов - резиновых, латексных, текстильных изделий, шовных и перевязочных материалов.
- Стерилизация растворов в емкостях из стекла и питательных сред.

Основные отличительные особенности:

- Универсален - подходит для стерилизации любых типов изделий с твердой, пористой и полый структурой - инструментов, резины, текстиля, растворов, питательных сред.
- Увеличенный срок службы - за счет применения коррозиестойкой стали, устойчивой к разрушительному действию ионов хлора.
- Превосходная герметизация камеры стерилизатора в течение всего срока службы (применен клинообразный запор в 6 точках).
- Можно подключить подъемное электрическое устройство для упрощения загрузки и разгрузки материалов в стерилизатор.
- Энергонезависимая память, в которую записываются результаты 21 ранее проведенного цикла стерилизации. Подключение печатного устройства для контроля результатов циклов необязательно.
- Устойчив к кратковременным сбоям напряжения в сети - если уровень температуры в камере не отклонился от допустимого интервала, при появлении напряжения цикл стерилизации будет возобновлен.

- Безопасен для персонала - блокировка открытия крышки при высоком давлении в камере, теплоизоляция крышки, безопасный спуск пара в случае срабатывания предохранительного клапана.
- Предельно прост в сервисе и ремонте .

Паровой стерилизатор автоматический (СПВА-74-1-НН)



Я просматривала смывы на стерильность рук и фиксировала данные в журнал. Смывы на стерильность рук медицинской сестры производятся стерильными инструментами и принадлежностями в стерильные емкости с соблюдением строжайших правил асептики непосредственно после обработки антисептиком и сразу после высыхания антисептика на коже рук. Посев производился в питательную среду с МПБ.

В конце работы произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

Затем я производила учёт антибиограммы в соответствии с выше приведённой методикой. Так же я фиксировала результаты в протокол исследования с эталонными штаммами при определении чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом на агаре Мюллер-Хинтона.

Набор антибиотиков для Enterobacteriaceae:

1. Амоксицилин
2. Ампициллин+сульбактам
3. Цефтриаксон
4. Цефтозидин
5. Цефоперазан+сульбактам
6. Гентамицин
7. Амикацин
8. Ципрофлоксацин

9. Перлоксацин
10. Меропинем
11. Имипенем
12. Эртапинем

Дополнительный набор:

1. Цефепим
2. Дорипенем
3. Моксифлоксацин
4. Левофлоксацин
5. Тайгепцилин
6. Фосфомицин

Протокол контрольного исследования с эталонными штаммами при определении чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

Порядковый номер протокола _____ Дата постановки контроля «12» 07 2019г

Объект исследования, № партии, серия/лот, срок годности, производитель: ИМПЕРИОН, п. №11 от 29.03.2019

ИД на метод исследования: _____

1. Национальные клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», МАКМАХ, 2018.*

2. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»*

Наименование средства в диске/АМП	Нагрузка, мкг/Ед.	Серия/ЛОТ Срок годности	Escherichia coli ATCC 35218 (зоны поавления роста в мм)		Результат в мм.
			Целевые	Допустимые	
Диски с антибиотиком Азтреонам	30 мкг				
Диски с антибиотиком Амикацин	30 мкг	0711367 07.02.2019			20
Диски с антибиотиком Амикацин	10 мкг				
Диски с антибиотиком Амоксициллин с клавулановой кислотой.	20 мкг/ 10мкг	575849 20.03.2019	19-20	17-22	
Диски с антибиотиком Ампцициллин	30 мкг	0401076 26.09.2018			15
Диски с антибиотиком Ампцициллин	10 мкг				
Диски с антибиотиком Ампцициллин/сульбактам	10 мкг/ 10мкг		16	13-19	
Диски с антибиотиком Гентамицин	10 мкг	64178316 20.08.18			20
Диск с антибиотиком Дорипенем	10 мкг	642030 06.02.18			31
Диск с антибиотиком Имипенем	10 мкг	642030 30.10.2018			30
Диски с антибиотиком Левофлоксацин	5 мкг	643049 30.11.2018			34
Диски с антибиотиком Меропенем.	10 мкг	643148 30.05.2018			30
Диски с антибиотиком Моксифлоксацин	5 мкг	783020 28.09.2018			31
Диски с антибиотиком Пефлоксацин	5 мкг				
Диски с антибиотиком Тигецилин	15 мкг	242036 30.11.2018			17
Диск с антибиотиком Тобрамицин	10 мкг				
Диски с антибиотиком Фосфомицин	200 мкг	642030 06.02.18			33
Диски с антибиотиком Цефепим	30 мкг				
Диск с антибиотиком Цефокситин	30 мкг				
Диски с антибиотиком Цефоперазон/Сульбактам	75 мкг/ 30 мкг	663047 15.02.2018			29
Диски с антибиотиком Цефотаксим	30 мкг				
Диски с антибиотиком Цефотаксим	5мкг				
Диски с антибиотиком Цефтазидим	30 мкг	633314 15.10.2018			30
Диски с антибиотиком Цефтазидим	10 мкг				
Диски с антибиотиком Цефтриаксон	30 мкг	705743 15.02.2019			32
Диски с антибиотиком Ципрофлоксацин	5 мкг	705243 30.03.2018			32
Диски с антибиотиком Эртапенем	10 мкг	705056 30.04.19			33

Агар Мюллера-Хинтона партия №11 от 29.03.2019

Заключение о соответствии требованиям по дискам: Соответствует / Не соответствует

При несоответствии перечислить: _____

Заключение о пригодности партии среды: Пригодна / Не пригодна

Отчет: антибиотограмм _____ Контролей сред _____ Пересевов _____

Исполнитель _____ « » 2019 г

Посевы ставят в термостат на 1 сутки.

В конце работы произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

День 7

23.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Просматривала бактериологическое исследование инструментария, перевязочного, шовного и другого хирургического материала на стерильность. Проводят согласно методическим указаниям «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях», МУК 4.2.2942-11. Результаты записывала в специальный журнал учёта.

Просматривала результаты биохимических тестов сделанных с целью идентификации неизвестных микроорганизмов.



Результаты: *Acinetobacter baumannii*

Морфология: *Acinetobacter* — плеоморфные короткие и округлые палочковидные бактерии, способные приобретать форму кокков при определенных условиях. Они являются аспорогенными, капсульными и неподвижными.

Тинкториальные свойства: Бактерии окрашиваются по Грамму в красный цвет и располагаются в мазке парами, короткими цепочками или беспорядочными скоплениями.

Биохимические свойства: Ацинетобактер — неферментирующий микроорганизм. Он не образует индол, сероводород и оксидазу, является каталазопозитивным и оксидазонегативным. Большинство штаммов разлагают сахара с образованием кислоты.

Затем я ознакомилась с инструкцией и провела определение цитохромоксидазы помощью специальных тест-полосок OXI-test:



Форма выпуска: 50 тест полосок в алюминиевой тубе для 50 определений, инструкция.

OXI-test - индивидуальный тест для обнаружения бактериальной цитохромоксидазы.

Проведение анализа: снимают хорошо изолированную колонию (или бактериальную массу в случае чистой культуры) тестируемого штамма с плотной питательной среды петлей втирают ее в диагностическую зону полоски.

Цветную реакцию следует учесть в течение 0,5–1 мин; позже могут возникнуть ложноположительные реакции.

В конце работы произвела дезинфекцию рабочей поверхности.

День 8

24.04.2019

Перед началом работы мы переодеваемся в специально отведённом помещении. Мы надеваем халат и сменную обувь.

Сегодня я ознакомилась и провела исследование на видовую идентификацию стафилококка в реакции плазмокоагуляции.

Реагентом для проведения биохимического исследования на определение видовой принадлежности микробактерий стафилококка является кроличья плазма цитратная сухая. Плазма кроличья в разведении 1:5 свертывается при контакте с культурой, которая содержит фермент коагулазу.

Готовится реагент следующим образом: содержимое ампулы нужно растворять стерильным 0,9 % раствором хлористого натрия из расчёта 1:5 от первоначального объёма. При вместимости в ампуле 1 мл препарата добавить 5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, а при вместимости 2 мл 10 мл. Приготовленный раствор можно хранить при температуре 6 градусов 24 часа.

Постановка реакции: в пробирку с 0,5 мл растворенной плазмы вносят 1 петлю суточной агаровой культуры исследуемого штамма, которую суспендируют в плазме.

Контроль: постановка реакции со стафилококками, которые содержат и не содержат фермент коагулазу, штатив ставят в термостат на 24 часа.

Учёт результатов: проверить наличие свёртываемости плазмы (образование сгустка) визуально. Появление на дне студнеобразного сгустка любого размера считается положительным результатом реакции. Отсутствие свёртывания в плазме расценивается как отрицательный результат.

