Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**Дневник**

производственной практики

по МДК 04.01. «Теория и практика лабораторных микробиологических и иммунологических исследований »

Иргита Сухраба Худойдодовича

ФИО

Место прохождения практики

Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярская городская детская больница № 8»

(медицинская организация, отделение)

с «18» мая 2023 г. по «31» мая 2023 г.

Руководители практики:

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

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Николаева А.П.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Методический – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_Жукова М.В.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Красноярск, 2023

**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 лабораторных / химических 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 микробиологических показателей, ведение документации.
5. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной ответственности.
6. Изучение основных форм и методов работы в бактериологической лаборатории.

**Программа практики.**

*В результате прохождения практики студенты должны уметь:*

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 производственной 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 микробиологический лаборатории;

- основные методы и диагностическое значение исследований протеолитических , сахаралитических, гемолитических свойств микроорганизмов, антигенной структуры.

**Тематический план**

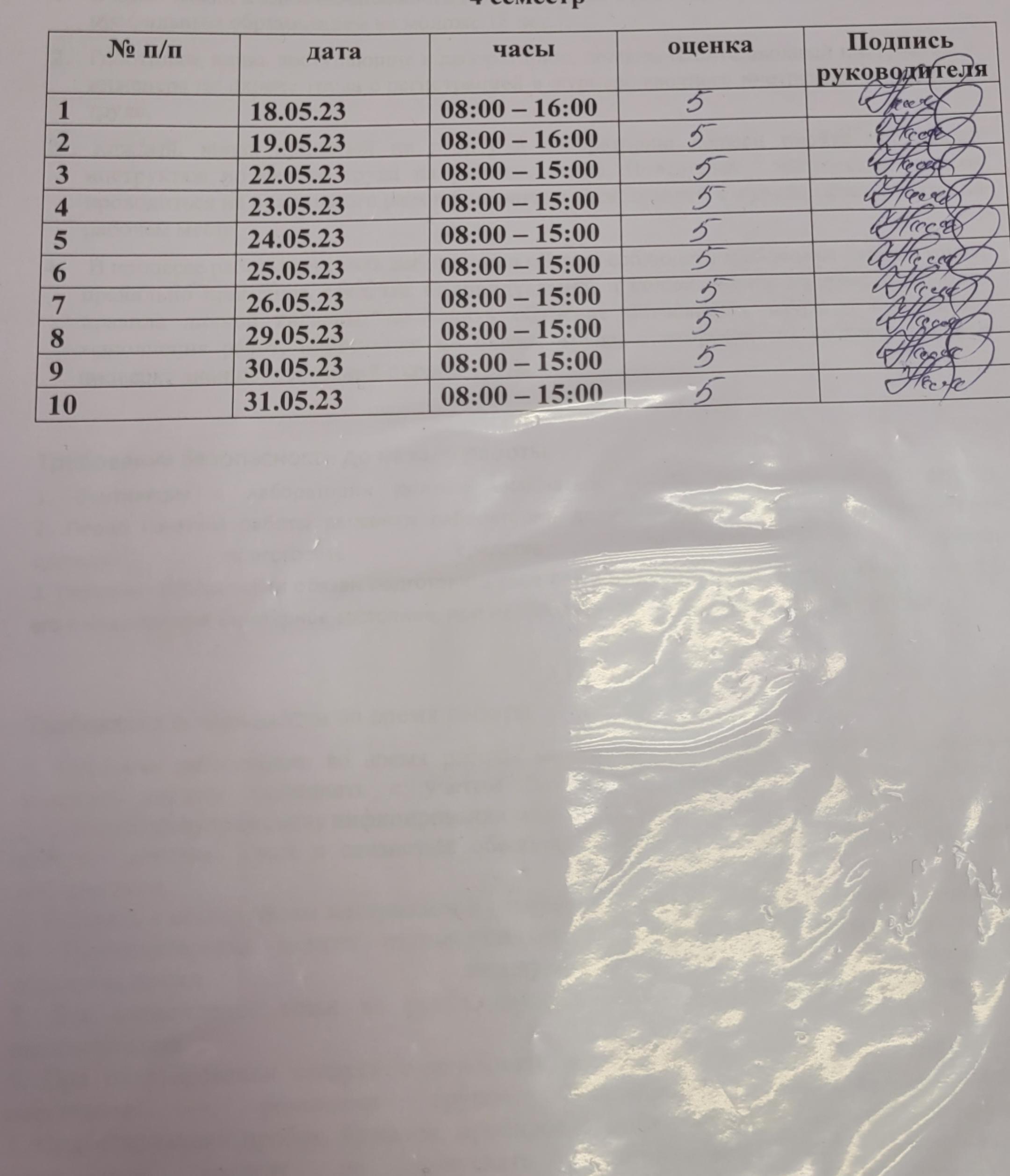
**Квалификация Медицинский технолог**

**4 семестр**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Наименование разделов и тем практики** | | **Всего часов** |
| 1 | Ознакомление с правилами работы в бак лаборатории | | 6 |
| 2 | Подготовка материала к микробиологическому исследованиям: прием , регистрация биоматериала | | 3 |
| 3 | Приготовление питательных сред общеупотребительных, элективных, дифференциально-диагностических. | | 3 |
| 4 | Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (гнойно-воспалительных, кишечных) | | 20 |
| 5 | Дисбактериоз. Этапы исследования . | | 22 |
| 5 | Иммунодиагностика : РА, РП, РСК,РИФ | | 6 |
| 6 | Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты. | | 6 |
| **Вид промежуточной аттестации** | | Дифференцированный зачет | 6 |
| **Итого** | | | **72** |

**График прохождения практики**

**4 семестр**

****

**Инструктаж по технике безопасности**

Общие требования безопасности

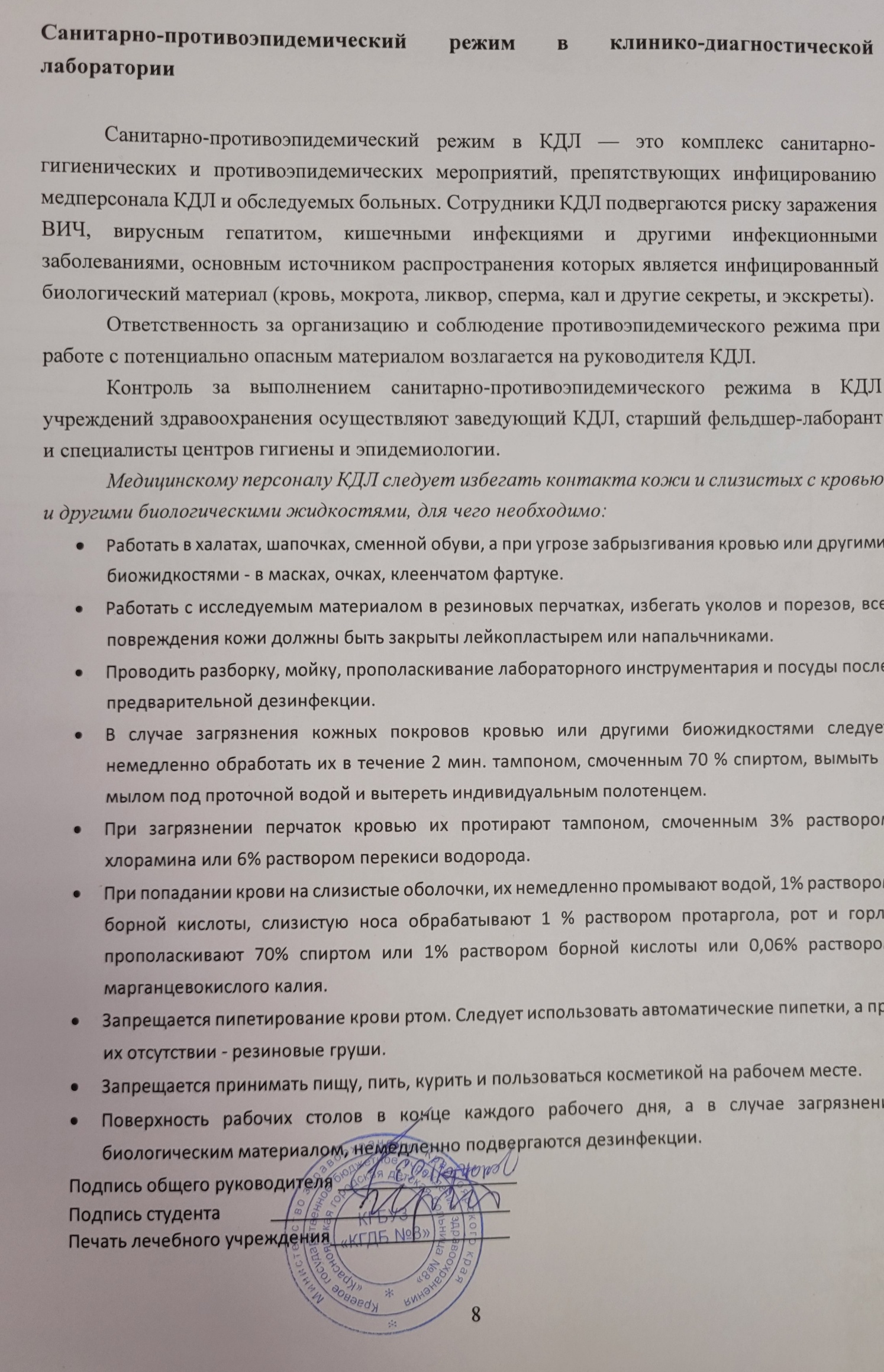
1. В химических и клинико-диагностических центрах к работе допускаются только лица с профильным образованием не моложе 18 лет.
2. Работники, вновь поступающие в лабораторию, должны пройти вводный инструктаж у инженера по охране труда с регистрацией в журнале вводного инструктажа по охране труда.
3. Каждый, вновь принятый на работу в лабораторию должен пройти первичный инструктаж по охране труда на рабочем месте. Повторный - инструктаж должен проводиться не реже одного раза в 6 месяцев с регистрацией в журнале инструктажа на рабочем месте.
4. В процессе работы персонал лаборатории обязан: соблюдать требования охраны труда; правильно применять средства индивидуальной и коллективной защиты; выполнять правила личной гигиены; проходить обучение безопасным методам и приемам выполнения работ, инструктаж по охране труда, стажировку на рабочем месте и проверку знаний требований охраны труда.

Требования безопасности до начала работы

1. Вентиляция в лаборатории должна включаться за 30 минут до начала работы.  
2. Перед началом работы персонал лаборатории должен надеть санитарно—гигиеническую одежду, приготовить средства индивидуальной защиты.  
3. Персонал лаборатории обязан подготовить свое рабочее место к безопасной работе, привести его в надлежащее санитарное состояние, при необходимости подвергнуть влажной уборке.

Требования безопасности во время работы

1. Персонал лаборатории во время работы не должен допускать спешки. Проведение анализов следует выполнять с учетом безопасных приемов и методов работы.   
2. С целью предупреждения инфицирования медицинскому персоналу лаборатории следует избегать контакта кожи и слизистых оболочек с кровью и другими биологическими материалами.  
3. Работать с исследуемым материалом в резиновых перчатках, избегая уколов и порезов.  
4. Транспортировка должна осуществляться в закрытых контейнерах, регулярно подвергающихся дезинфекционной обработке.  
5. Все повреждения кожи на руках должны быть закрыты лейкопластырем или напальчниками.  
6. При пипетировании следует использовать автоматические пипетки, а в случае их отсутствия — резиновые груши. Запрещается пипетирование ртом.  
7. При открывании пробок, бутылок, пробирок с кровью или другими биологическими материалами следует не допускать разбрызгивания их содержимого.  
8. Рабочие места для проведения исследований мочи и кала, должны быть оборудованы вытяжными шкафами с механическим побуждением.

****

**Лист лабораторных исследований.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследования. | Итог | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |  |  |  |
| Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ. |  | 140 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |  |  | **380** |
| Изучение культуральных, морфологических св-в |  |  | 7 | 10 | 6 | 12 | 10 | 8 |  |  |  |  | **53** |
| Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитичес кой активности |  |  | 7 | 10 | 6 | 12 | 10 | 8 |  |  |  |  | **53** |
| Серодиагностика |  |  |  |  |  |  |  |  | 4 |  |  |  | **4** |
| РП |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  | **1** |
| РСК |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  | **1** |
| РИФ |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  | **1** |
| РА |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  | **1** |
| Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; |  | 10 | 98 | 97 | 77 | 79 | 71 | 72 | 64 | 57 |  |  | **625** |
| участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  | **1** |
| Санитарная микробиология исследование воздуха |  |  | 4 | 2 |  |  | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  | **10** |
| Санитарная микробиология исследование смывов с рук и объектов  окружающей среды |  |  | 80 | 45 | 35 | 25 | 20 | 25 | 25 | 25 |  |  | **280** |

**ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ**

Ф.И.О. обучающейся \_Иргит Сухраб Худойдодович

группы\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_221\_\_\_\_\_\_\_\_\_ специальности Лабораторная диагностика

Проходившей производственную практику

с 18.05.23 по \_\_\_31.05.23\_г

За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

1. Цифровой отчет

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | Виды работ 4 семестр | **Количество** |
| 1. | Изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ: | 19 |
| 2. | Прием, маркировка, регистрация биоматериала. | 10 |
| 3. | Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ. | 22 партии (380 ёмкостей) |
| 4. | Изучение культуральных, морфологических свойств | 53 |
| 5 | Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитической активности | 53 |
| 6 | Серодиагностика РА | 4 |
| 7 | РП | 1 |
| 8 | РСК | 1 |
| 9 | РИФ | 1 |
| 10 | РА | 1 |
| 11 | Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; | 625 |
| 12 | Участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований | 1 |

**Текстовой отчет**

1. Умения, которыми хорошо овладел в ходе практики: Изучил нормативные документы, организовывал рабочее место, готовил материал к микробиологическим исследованиям, определял культуральные и морфологические свойства, принимал и регистрировал материал, утилизировал отработанный материал

1. Самостоятельная работа: Посевы биологического и санитарно-биологического материала, ведение санитарно-бактериологических исследований, приготовление питательных сред, проведение дезинфекции рабочего места по завершению лабораторных работ

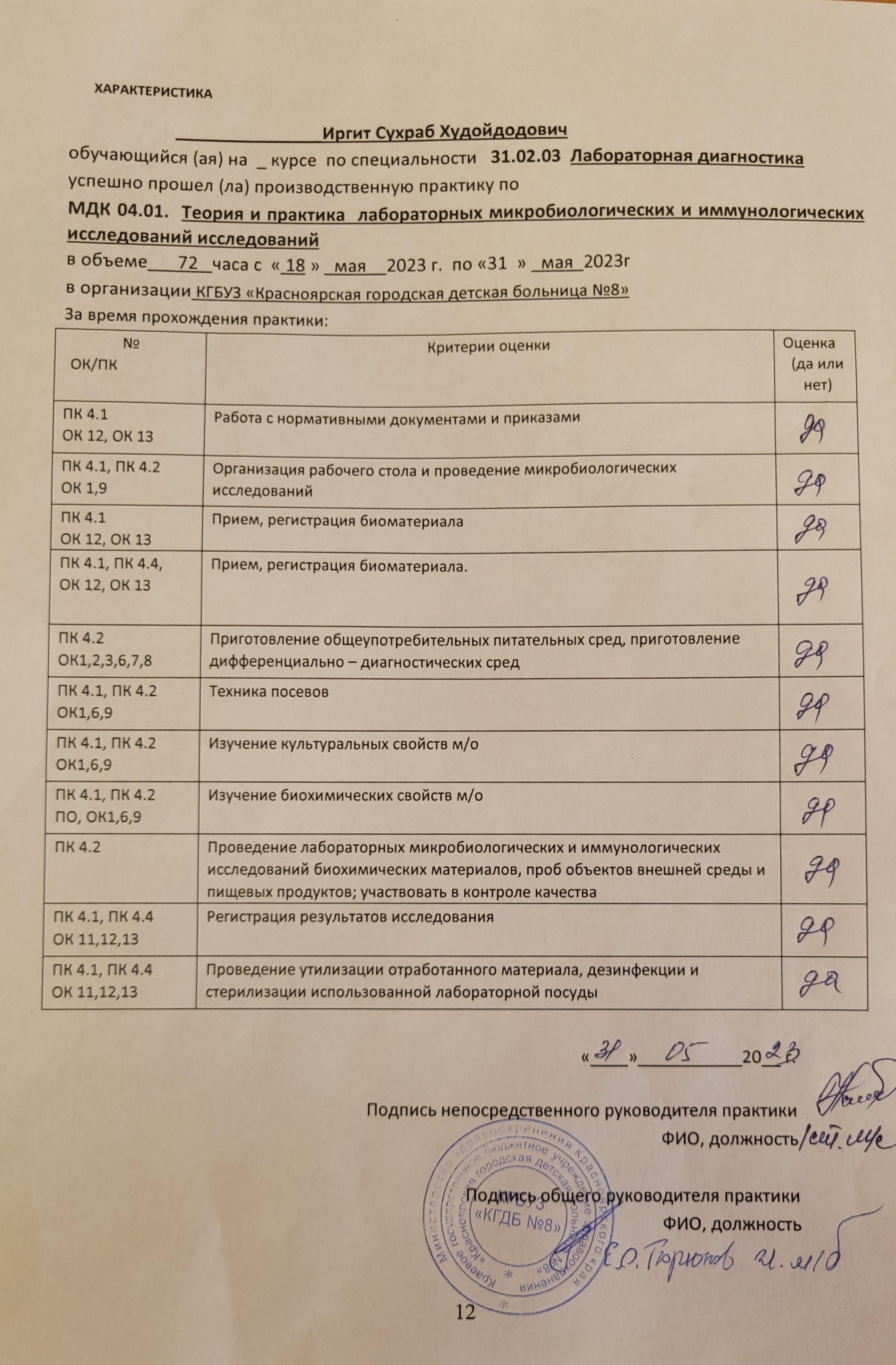
Помощь оказана со стороны методических и непосредственных руководителей: помощь оказана в полном объеме

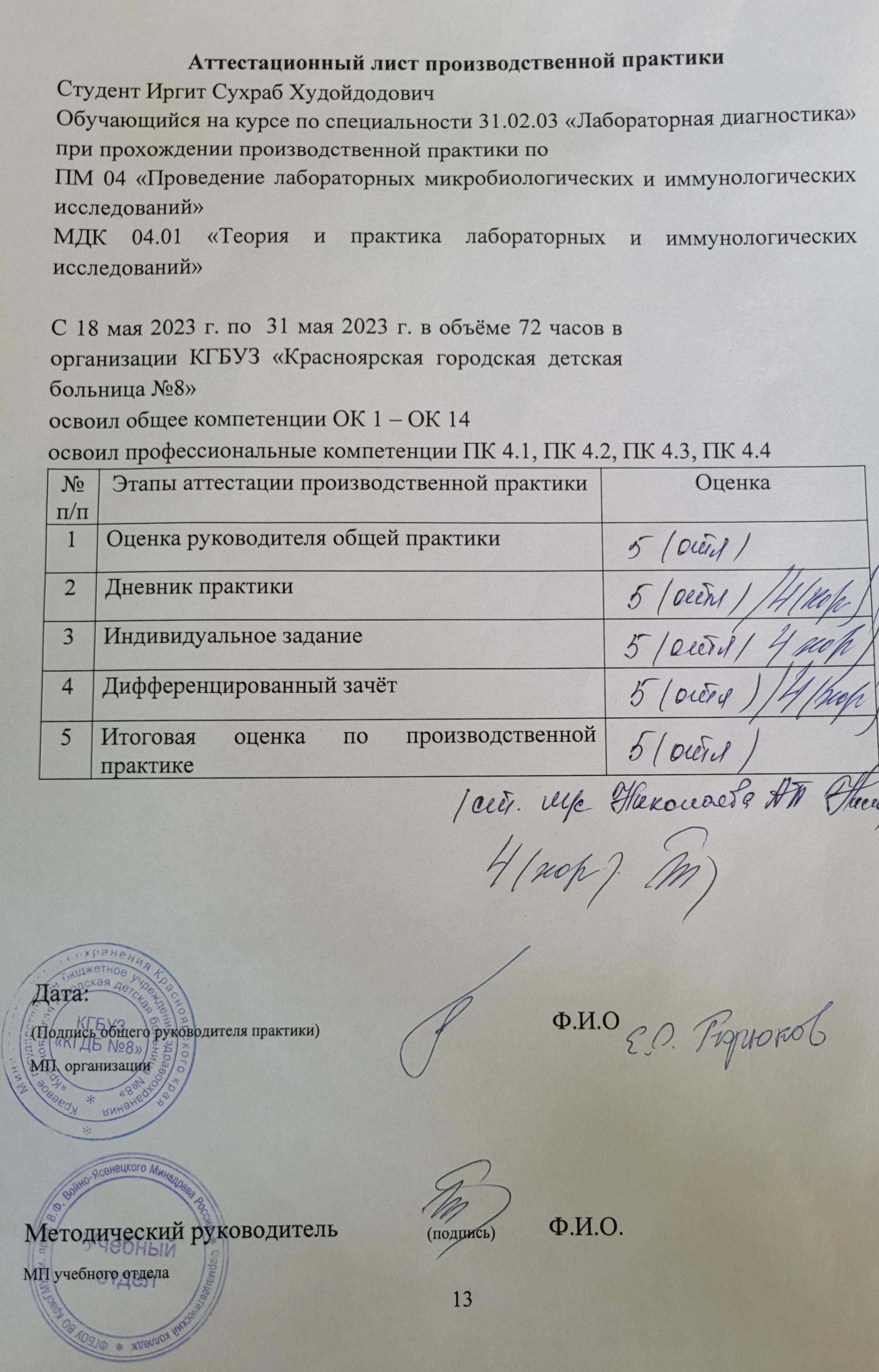
Замечания и предложения по прохождению практики: замечаний нет

Общий руководитель практики **\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(подпись) (ФИО)

М.П.организации





**День 1 (18.05.2023г)**

**Ознакомление с правилами работы в КДЛ. Инструктаж по технике безопасности, охране труда и противопожарной безопасности.**

1. Изучил нормативные документы, регламентирующие санитарно-противоэпидемиологический режим в КДЛ, и ознакомилась с правилами работы в бактериологическом отделе лаборатории.

Главные документы, на основании которых ведутся работы в Бактериологическом отделе КДЛ:

1. Инструкция № 001БО По правилам соблюдения противоэпидемического режима (режима биологической безопасности) в бактериологическом отделе клинико-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 клинико-диагностической лаборатории;
3. Инструкция № 004 По соблюдению санитарно-эпидемиологических требований к обращению с медицинскими отходами в бактериологическом отделе клинико-диагностической лаборатории;
4. ИОТ - № 32 КДЛ Инструкция по охране труда для персонала клинико-диагностической лаборатории.

Дополнительные документы, на основании которых ведутся работы в бактериологическом отделе КДЛ:

1) Ориентировочный перечень объектов, подлежащих микробиологическому контролю методом смывов в рамках Программы производственного контроля КГБУЗ «КГДБ №8»;

2) Инструкция №006 БО КДЛ Техника отбора проб биоматериалов и правила их транспортировки и бактериологический отдел клинико-диагностической лаборатории;

3) Инструкция №005 БО КДЛ Порядок отбора проб на санитарные исследования по микробиологическим (бактериологическим) показателям в КГБУЗ «КГДБ №8»;

4) Инструкция №53 КДЛ БО По охране труда при работе с горелкой спиртовой (спиртовкой) лабораторной;

5) Инструкция №79 КДЛ БО По охране труда при работе с устройством автоматического отбора проб биологических аэрозолей воздуха ПУ-1Б исполнением 1ЕВКН4.471.014-01;

6) Инструкция №82 КДЛ БО По охране труда при работе со шкафом сушильным ШС-80-01 СПУ исполнением ПГИЖ.681945.006-04 без принудительным конвекции;

7) Инструкция №80 КДЛ БО По охране труда при работе со стерилизатором воздушным настольным с программным управлением циклами и системой принудительного охлаждения ГП-80-Ох-«ПЗ».

Прочие изученные мною документы:

1. Инструкция № 33 По охране труда при эксплуатации медицинской техники;
2. Инструкция № 29 По охране труда при эксплуатации ультрафиолетовых облучателей (бактерицидных ламп);
3. Инструкция № 15 По охране труда при эксплуатации аквадистилляторов;
4. Инструкция № 9 По охране труда при работе со шкафами-стерилизаторами;
5. Лекция вводного инструктажа по охране труда в КГБУЗ КГДБ №8
6. Инструкция № 17 По охране труда при выполнении работ с кровью и другими биологическими жидкостями пациентов;
7. Положение о пропускном и внутриобъектном режимах.

2. Прошёл инструктаж по охране труда и по соблюдению требований биологической безопасности при выполнении работ в клинико-диагностической лаборатории с бактериологическим отделом КГБУЗ КГДБ №8

3. Ознакомился со структурой бактериологического отдела КГБУЗ КГДБ №8

Краткая характеристика объекта.

Детский стационар является структурным подразделением клинико-диагностической лаборатории КГБУЗ «КГБУЗ КГДБ №8» и располагается по адресу: г. Красноярск, ул. 40 лет Победы, дом 14, на 1 этаже приёмного покоя

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

*- Исследование клинического материала от больных по профилю неинфекционного стационара.*

Исследования клинического материала от пациентов с заболеваниями микробного происхождения необходимы для непосредственного установления возбудителя, оптимизации применения антимикробных (антибактериальных и противогрибковых) препаратов и мероприятий в области профилактики, контроля и сдерживания резистентности на локальном уровне - в профильных отделениях и стационаре в целом;

*- Санитарно-микробиологические исследования в рамках программы производственного и внутрилабораторного контроля.*

Санитарно-микробиологический мониторинг направлен на контроль механизмов возможной передачи внутрибольничных инфекций (инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи), основными из которых являются воздушно-капельный, воздушно-пылевой, контактно-бытовой (через предметы ухода и руки медицинского персонала), парентеральный и артифициальный.

**День 2 (19.05.2022г)**

**Работа в «заразной» зоне: приём и регистрация биоматериала.**

**Работа в «чистой» зоне: приготовление питательных сред.**

1. Работа в «заразной» зоне.

Вход в «заразную» зону осуществлялся через санпропускник, где я сменила медицинские халат для «чистой» зоны на халат для «заразной».

Приём биологического материала проводится в «заразной» зоне лаборатории в комнате приёма проб через передаточное окно. Биоматериал убирается в специальные пластиковые контейнеры, закрывающиеся крышками и имеющие маркировку и изображение знака биологической опасности (Рисунок 2).

Доставленные на исследования пробы регистрируются в соответствующих журналах установленного образца. Далее биоматериал маркируется и в специальном контейнере доставляется на тележке в соответствующие назначенным исследованиям кабинеты.



Рисунок 2 - Контейнер приёма биоматериала

2. Приготовление питательных сред.

Питательная среда - жидкий, полужидкий или плотный субстрат, используемый для выращивания микроорганизмов.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

-Питательные среды должны содержать все необходимые для питания микроба питательные вещества, т.е. обладать питательностью

-Питательные среды должны быть влажными

-Питательные среды должны иметь оптимальную pH (7,2-7,6) кислотность среды

-Обладать изотоничностью (конц. NaCl 0,87%)

-Иметь оптимальный электронный потенциал, свидетельствующий о содержании в среде растворенного кислорода.

-Среды должны быть прозрачными, чтобы был виден рост бактерий

-Среды должны быть стерильными, чтобы не было других бактерий

Этапы приготовления питательных сред:

1. Подготовка посуды. Посуда должна быть сухой, стерильной.

2. Расчет сухого вещества и количества воды производят в соответствии с инструкцией, указанной на упаковке. Сухое вещество взвешивают на весах, дистиллированную воду отмеряют мерным стаканчиком.

3. Питательная среда варится на электроплите при тщательном размешивании, до полного растворения сухого вещества и закипания среды.

4. Готовую среду разливают во флаконы, стерилизуют в паровом стерилизаторе, с использованием необходимых индикаторов.

5. Флаконы со средой закрывают марлевыми пробками, прикрепляют этикетку на которой отмечают название среды, номер по журналу, дату приготовления.

Произвел маркировку уже простерилизованных и остывших питательных сред в пробирках, с указанием вида среды, номера партии среды и даты изготовления среды. Провел уборку рабочего места. Далее, пройдя через санпропускник, расставила все чашки и пробирки со средами по холодильникам на территории «заразной» зоны.

**День 3 (22.05.2023г)**

**Работа в отделе исследования клинического материала (первый день).**

**Работа в отделе санитарных исследований.**

**Вводный/первичный инструктаж.**

1. Клинический отдел: выделение и идентификация микроорганизмов (первый день).

Биоматериал, доставленный в кабинет клинических исследований в бактериологическом отделе КДЛ, сеется на шесть основных сред и одну дополнительную (Рисунок 3):



Рисунок 3 - Посевы на различные питательные среды

1). Среда Эндо (для выращивания Гр.- бактерий кишечной группы и определения их способности расщеплять лактозу);

2). Кровяной агар (для выращивания стрептококков и для определения гемолитической активности микроорганизма);

3). Желточно-солевой агар (ЖСА) для выделения стафилококка, определения лецитиназной активности микроорганизма по наличию или отсутствию вокруг колоний «радужного венчика»;

4). Энтерококк-агар с индикатором (для выделения энтерококка);

5). Среда Сабуро (для выделения дрожжевых и мицеллярных грибов);

6). Среда Кандида, (хромогенная среда для выделения дрожжеподобных грибов и ориентировочной идентификации до вида).

Также часто дополнительно используется хромогенный агар для уропатогенных бактерий. На данном агаре в первичном посеве колонии разных микроорганизмов будут отличаться по цвету, что значительно ускоряет процесс идентификации патогенных микроорганизмов.

Если предполагается, что концентрация микроорганизмов в биоматериале слишком мала для прямого посева, то в первый день производят посев в среду накопления (обогащения) - сердечно-мозговой бульон.

Посевы убираются в термостаты на инкубацию при t+36±1о С на 16-24 часа.

2. Санитарный отдел.

Задачей санитарных исследований в бактериологическом отделе КДЛ является эпидемиологический контроль безопасности оказания медицинских услуг.

Объектами санитарно-бактериологических исследований являются: воздушная среда; объекты окружающей среды в том числе, изделия медицинского назначения, изделия из резины и металла, спец.одежда; руки персонала.

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

Отбор проб производят:

- на общее количество микроорганизмов (общее микробное число – ОМЧ) в 1 м3 воздуха;

- на наличие S.aureus в 1 м3 воздуха;

-. для подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов.

В данной лаборатории отбор проб воздуха производят с помощью Аспиратора ПУ-1Б (Рисунок 4).

Количество пропущенного воздуха должно составлять 250 дм3 (250л) для определения S.aureus.

Для определения общего количества микроорганизмов в 1 м3 воздуха персонал должен производить отбор на чашку Петри с питательным агаром типа МПА (мясо-пептонный агар), ГРМ-агар или иным, разрешенным к применению для данного вида исследования.



Рисунок 4 - Аспиратор ПУ-1Б для определения бактериальной обсеменённости воздушной среды

Для определения наличия S.aureus в 1 м3 воздуха персонал должен производить отбор на чашку Петри с питательным агаром типа ЖСА (желточно- солевой агар) , или иным разрешенным к применению для данного вида исследования.

Для определения общего количества грибов в 1 м3 воздуха, используется среда Сабуро (питательная среда предназначена для выращивания и подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов).

Ход работы:

1. Перед отбором каждой пробы воздуха для обеззараживания решетки используется фламбирование (обжиг в пламени) для этого необходимо: снять решетку, смочить решетку 95% этиловым спиртом, обжечь в пламени спиртовки до полного сгорания спирта на решетке.

2. Поместить открытую часть стандартной чашки Петри с агаром в держатели аспиратора, плотно присоединить решетку путем наворачивания, соблюдая осторожность, чтобы не повредить резьбу.

3.Включить прибор. Для запуска нажать кнопку «ВКЛ.» Контролировать индикатор «ОБЪЁМ ПРОБЫ»-4 красных цифровых светодиодных индикаторов, индуцирующих объем отбираемой пробы.

4. По завершению отбора пробы выключить аспиратор кнопкой «ВЫКЛ», снять решетку и извлечь чашку Петри, закрыть ее крышкой и убрать в транспортный контейнер.

5. Емкости с пробами маркируются в соответствии с нумерацией, указанной в сопроводительной документации.

6. Окончательный результат для показателя «Общее количество микроорганизмов»= «Общее микробное число»= «ОМЧ» выражается в единицах КОЕ/ м3 (колоние-образующих единиц в 1м3), что соответствует количественному содержанию микроорганизмов в 1м3 .

7. Окончательный результат на наличие S.aureus оформляется заключением «S.aureus обнаружен» или «S.aureus не обнаружен» что соответствует наличию/отсутствию микроорганизмов вида S.aureus в 1м3. Результаты исследования оформляются протоколом установленного образца.

8. Окончательный результат для подсчёта грибов не нормируется, но в идеале отсутствует.

Бактериологический контроль эффективности обработки рук персонала

Обработку рук хирургов проводят все участвующие в проведении оперативных вмешательств, катетеризации магистральных сосудов. Обработка проводится в два этапа: I этап - мытье рук мылом и водой в течение двух минут, а затем высушивание стерильным полотенцем (салфеткой); II этап - обработка антисептиком кистей рук, запястий и предплечий.

Контроль качества обработки рук хирургов проводят после обработки антисептиком и до надевания стерильных перчаток.

Отбор проб производят на соответствие показателю «Стерильность»

Эффективность обработки оценивают на основании результатов бактериологических исследований при контроле стерильности смывов с обработанных рук.

Отбор проб производится стерильными инструментами и принадлежностями в стерильные емкости с соблюдением строжайших правил асептики непосредственно после обработки антисептиком и сразу после полного высыхания антисептика на коже рук.

Тампон/салфетку (размер салфетки 5х5 см) увлажняют стерильной жидкостью, тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук хирургов и операционных медицинских сестер после процедуры обработки. Каждую салфетку/тампон помещают в отдельную пробирку (колбу, флакон). Для отбора каждой пробы используют при захвате салфетки отдельный стерильный пинцет/ корцанг. Емкости с пробами маркируются в соответствии с нумерацией, указанной в сопроводительной документации. Транспортировка в лабораторию.

Стандартно для контроля стерильности используют тиогликолевую среду (среду для контроля стерильности). На каждую пробу используют по три пробирки тиогликолевой среды. Производят отмыв (встряхивание) марлевой салфетки/тампона. Отмывную жидкость засевают по 0,5 мл в 2 пробирки с 5 мл тиогликолевой среды, марлевую салфетку/тампон помещают в пробирку с тиогликолевой средой. Посевы инкубируют при температуре 32,5±2,5° С, в течение 48 часов.

Окончательный результат по показателю «Стерильность» оформляется заключением «Роста микрофлоры нет/Стерильно» или «Рост микрофлоры обнаружен /Нестерильно».

Бактериологическое исследование инструментария, перевязочного 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°С, а в среде Сабуро — при 20—25°С. Посевы выдерживают в термостате в течение 7 суток при паровой стерилизации просматривая их каждый день. 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.

Выход из «заразной» зоны осуществлялся через санпропускник со сменой халата и с тщательной обработкой рук антибактериальным мылом и кожным антисептиком согласно схеме (Рисунок 5).



Рисунок 5 - Памятка по гигиене рук для персонала лаборатории

**День 4 (23.05.2023г)**

**Работа в отделе исследования клинического материала (второй день).**

**Работа в отделе санитарных исследований.**

1. Клинический отдел: выделение и идентификация микроорганизмов (второй день).

Мною были проведены посевы «по Голду» или «на сектора» для выделения изолированных колоний на шесть основных сред согласно предоставленной схеме (Рисунок 7).



Рисунок 7 - Схема посева

Все манипуляции выполнялись в СИЗ и с соблюдением техники безопасности.

Тампоном я размешала среду накопления и произвела посев, предварительно отжав лишнюю влагу с тампона о внутренние стенки пробирки, (30-40 штрихов) на первый сектор чашек Петри с питательными средами. После этого взял бактериологическую петлю, прожгла её в средней части пламени горелки и произвел 4 штриховых посева ребром петли из первого сектора по второй, аналогичным образом из второго сектора в третий, а из третьего в четвёртый, прожигая петлю после пересева с каждого сектора. Чашки убрала инкубировать в термостат. Пробирку с биоматериалом убрала в специальный контейнер для дальнейшего обеззараживания. Рабочее место обработала дез.средством. Перчатки обработала дез.средством и поместил в контейнер с отходами класса Б.

2. Санитарный отдел.

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 высев смывной жидкости в пробирку солевого бульона. Инкубируют при температуре + 37°С в течение 18-24 часов.

Определял на глаз мутность, сравнивая с пробиркой контроля, после чего сделала пересев на ЖСА и Эндо.

Подготовил пробирки со средой накопления для взятия смывов. Пронумеровала пробирки и штативы. Погрузила в каждую пробирку стерильный тампон.

**День 5 (24.05.2023г)**

**Работа в отделе исследования клинического материала.**

**Работа в отделе санитарных исследований.**

1. Клинический отдел: выделение и идентификация микроорганизмов (третий день).

На третий день просмотрела посевы на чашках Петри в отражённом свете на наличие колоний. Колонии выросли только на среде Эндо в первом и втором секторах. Колонии однообразные, маленькие, круглые, розовые (лактозоотрицательные).

Из выросших изолированных колоний приготовила мазки.

Промаркировал чашки Петри маркером (на донышке), подсчитала сколько понадобится стёкол (2 мазка на одно предметное стекло).

Обезжирил предметные стёкла 95% раствором этилового спирта и разложила их на специальном планшете.

Промаркировал стеклографом стёкла (снизу), разделила на 2 части линией.

Нанес по капле физиологического раствора на стёкла.

Петлёй внес исследуемый материал из подозрительных колоний и распределила тонким равномерным слоем. Петлю обжигал пламенем горелки до начала работы и после каждого мазка.

Мазки высушил на воздухе.

Занес данные в журнал микроскопии.

Для фиксации мазков предметные стёкла (мазком вверх) медленно провела 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.

Фиксированные мазки окрасила по Граму. Окраску провел в вытяжном шкафу.

Мазки разложил на мостиках над ванночкой, накрыв сверху каждый из них фильтровальной бумагой.

На фиксированные мазки налил генцианового фиолетового карболового и выдержала при комнатной температуре (+18-25С) в течение 1минуты.

Слил краску и, не промывая мазки водой, налил на них раствор Люголя, выдержала при комнатной температуре в течение 1 минуты.

Слил раствор Люголя и, не промывая, налил 95% этиловый спирт (не более 30 сек).

Промыл мазки большим количеством дистиллированной воды.

Залил поверхность мазков рабочим раствором фуксина и выдержал мазок при комнатной температуре в течение 2 минут

Слил краску со стёкол, промыл мазки водой, высушил с помощью естественной сушки в наклонном положении при комнатной температуре.

Гр.+ микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый или фиолетовый с синим оттенком цвет, Гр.- микроорганизмы – в красный цвет. Микроскопия проводится с помощью иммерсионной техники с увеличением в 1000 раз. При микроскопии обнаружились Гр.- овоиды. Данные записала в журнал микроскопии.

В зависимости от культуральных, морфологических и тинкториальных свойств микроорганизма назначают различные исследования:

Изучение биохимических свойств:

Оксидазный тест - определение бактериальной цитохромоксидазы;

ВП-тест;

Стрептотест;

Энтеротест.

Определение чувствительности к АМП и факторов устойчивости к АМП:

Антибиотикочувствительность;

БЛРС-тест;

CIM-тест.

Постановка антибиотикограммы

Диско-диффузионный метод оценки чувствительности бактерий к антимикробным препаратам.

Диско-диффузионный метод, будучи одним из старейших, остается наиболее распространенным методом оценки антибиотикочувствительности в практических бактериологических лабораториях. Этот метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в том числе и для наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального оборудования. Предлагаемый ниже вариант диско-диффузионного метода стандартизован EUCAST.

Для получения достоверных результатов, необходимо четко следовать описанной методике без каких-либо отступлений.

Таблица 2 - Питательные среды для определения чувствительности бактерий к антибиотикам

|  |  |
| --- | --- |
| Микроорганизм | Среда |
| Enterobacteriaceae | МХА |
| Pseudomonasspp. | МХА |
| Stenotrophomonasmaltophilia | МХА |
| Acinetobacterspp. | МХА |
| Staphylococcusspp. | МХА |
| Enterococcusspp. | МХА |
| Стрептококки групп A, B, Cи G | MХА-П1 |
| Streptococcuspneumoniae | MХА-П1 |
| СтрептококкигруппыViridans | MХА-П1 |
| Haemophilusinfluenzae | MХА-П1 |
| Moraxellacatarrhalis | MХА-П1 |
| Listeriamonocytogenes | MХА-П1 |
| Pasteurellamultocida | MХА-П1 |
| Campylobacterjejuniиcoli | MХА-П1 |
| Corynebacteriumspp. | MХА-П1 |
| Aerococcussanguinicolaиurinae | MХА-П1 |
| Kingellakingae | MХА-П1 |

\*1 MХА-П1 - Мюллер-Хинтон агар + 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД

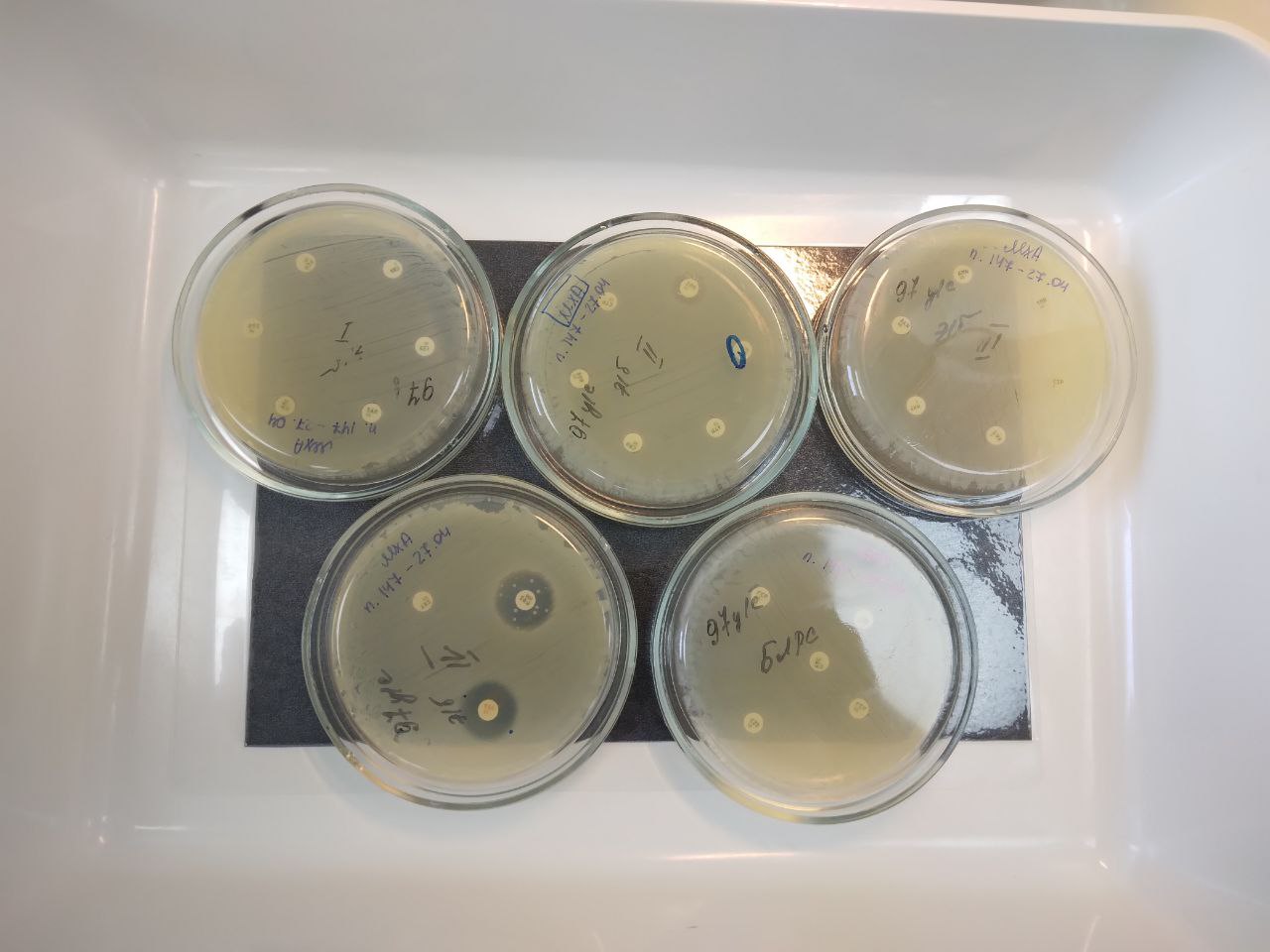


Рисунок 8 - Антибиотикограмма

Для энтеробактерий ставится антибиотикограмма с 21 антибиотиком и БЛРС (Рисунок 8). Результаты снимаются путём измерения диаметра задержки роста вокруг диска, пропитанного антибиотиком. Данные записываются в журнал и сверяются с нормами по таблицам.

Учёт биохимической активности ведётся с помощью посева на ряд сред с индикаторами:

Клиглера (определяют способность к выделению сероводорода, окислению и ферментации глюкозы и лактозы);

Хью-Лейфсона (окисление или ферментация глюкозы);

Пешкова (подвижность);

Цитратный агар Симонса;

Среда с маннитом;

Мюллер-Хинтон агар при температуре 42°С

(Рисунок 9).

Постановка оксидазного теста (определение бактериальной цитохромоксидазы)

Провел определение бактериальной цитохромоксидазы с помощью тест-полосок «ОКСИтест». Бактериальной петлёй сняла хорошо изолированную колонию с питательной среды и втёрла её в диагностическую зону полоски.

Результат учитывается в ближайшие 0,5-1 мин. Если индикатор остаётся того же цвета, что и был (серого), то тест на оксидазу отрицательный. Если цвет индикатора меняется (на синий), то тест на оксидазу положительный (Рисунок 9).



Рисунок 9 - Учёт биохимической и оксидазной активности

2. Санитарный отдел.

Отсмотрел пробирки с тиогликолевой средой и бульоном Сабуро для контроля сред на стерильность. Внес данные в соответствующий рабочий журнал установленного образца.

Определял на глаз мутность смывов с объектов окружающей среды в режимных помещениях (с моюще-дезинфицирующей машины), сравнивая с пробиркой контроля. Данные заносил в журнал установленного образца. Далее производила высев смывов на чашки Петри со средами Эндо и ЖСА.

Чашки Петри со средами заблаговременно вынула из холодильника и поставила прогреваться при комнатной температуре. Среду Эндо защитила от света.

Каждую чашку маркером расчерчивал на четыре сектора (на одну чашку засевается четыре смыва). Промаркировал каждый сектор в соответствии с номерами пробирок смывов. Аккуратно отжав тампон о внутренние стенки пробирки, произвел посев.

Чашки Петри с посевами убрал в термостаты

Пробирки со смывами составила в пластиковые коробочки, поместил в специальный контейнер для временного хранения и транспортировки в «грязную» автоклавную для обеззараживания.

Произвел учёт роста колоний микроорганизмов на чашках Петри со средами Эндо и ЖСА, на которые высевала смывы 18.05.2023 г. Роста колоний не обнаружил. Данные занес в соответствующий журнал установленного образца. Чашки Петри с посевами поместил в специальные контейнеры для временного хранения и транспортировки в «грязную» автоклавную для обеззараживания.

**День 6 (25.05.2022г)**

**Первый этап исследования дисбактериоза.**

**Работа в отделе санитарных исследований.**

1. Дисбактериоз: первый день исследования.

Нормальная микрофлора кишечника – это совокупность множества микробиоценозов, характеризующая определенным составом и занимающая определенный биотоп в организме человека.

Нарушение микробиологического равновесия в ЖКТ приводит к формированию дисбактериоза, к развитию экзо - и эндогенной инфекции.

Биомасса микробов, заселяющих кишечник человека, составляет примерно 5% его общего веса (не менее 2,5кг). Нормальная флора на 95% состоит из анаэробных видов бактерий: бактероиды, бифидобактерии, лактобактерии, различные споровые формы. Аэробные бактерии – 1-4%.

Бактероиды – антагонисты шигелл, сальмонелл, эшерихий. Они составляют 24-43% всей микрофлоры и играют важную роль в обеспечении толерантности к пищевым антигенам, принимают участие в переваривании, расщепляют желчные кислоты, участвуют в процессах липидного обмена, некоторые из них (B fragilis) способны вызывать различные гнойно - септические заболевания.

Бифидобактерии – грамположительные неспорообразующие облигатно-анаэробные палочки, они составляют от 40 до 95% от общего числа выделенных бактерий в зависимости от возраста.

1 г нативных фекалий без консерванта растираю в ступке с 9 мл физиологического раствора (10-1). Из этого разведения делаю посев на плотные питательные среды, обычно применяемые для выделения патогенных энтеробактерий (среду Плоскирева, среды Плоскирева или Левина с синтомицином или другим антибиотиком). Одновременно делаю массивный посев из нативного кала на жидкие среды обогащения (Мюллера, селенитовую, магниевую).

Из основного разведения 1:10 делаю дополнительные 100-кратные разведения в физиологическом растворе до 10-3 - 10-5, затем из пробирки, в которой фекалии разведены до 10-5, вношу по 0,1 мл на поверхность среды Эндо, Левина, Сабуро, и 0,01 мл на 3 - 5 % кровяной агар. Посев испражнений для обнаружения патогенных грибов можно также проводить на рисовой, картофельной и других применяемых в лаборатории питательных средах. Для получения роста изолированных, доступных для счета, колоний применяют стеклянные бусы.

Стеклянные круглые бусинки (заранее простерилизованные по 10 - 12 штук в пробирке) опускаю в чашку с посевным материалом. При легком покачивании чашки с бусами в течение одной минуты материал равномерно распределяется по питательной среде. Посев бусами начинаю со среды, на которой посеяно наибольшее разведение материала, т.е. с кровяного агара, а затем бусы переносят на чашки с другими средами.

Для посева на бифидобактерии делаю дополнительно еще 2 - 3 разведения до 10-7 -10-9 - 10-11. В первую пробирку с 9 - 10 мл среды Блаурокк вношу 1 мл из разведения фекалий 10-7, во вторую - 0,1 мл из этого же разведения, в третью и четвертую пробирку вношу соответственно по 1,0 и 0,1 мл из разведения 10-9, а в пятую и шестую по 1,0 и 0,1 мл из разведения 10-11. Все среды, за исключением среды Сабуро, помещаю в термостат при температуре 37° на 20-22 часа.

2. Санитарные исследования: учёт роста колоний на средах Эндо и ЖСА. Высев смывов.

Просмотрел чашки Петри с посевами на средах Эндо и ЖСА на наличие роста колоний микроорганизмов. Результаты зафиксировал в журнале установленного образца. Чашки Петри, на которых обнаружил рост, промаркировал и отложил для микроскопии. Чашки Петри с посевами на среде Эндо без признаков роста «сбросила», т.е. поместил в специальный контейнер для транспортировки в «грязную» автоклавную для обеззараживания. Чашки Петри с посевами на среду ЖСА без признаков роста убрал в термостат на вторые сутки. Чашки Петри с посевами на среду ЖСА, которые отстояли в термостате двое суток без признаков роста на них колоний микроорганизмов, «сбросила». Сделал мазки подозрительных колоний микроорганизмов с отложенных для микроскопии чашек Петри. Внес данные о мазках в журнал установленного образца. Зафиксировал мазки и окрасил их по Граму.

Произвел просмотр смывов на стерильность с высевом на питательные среды и регистрацией предварительных результатов в журналах установленного образца.

Смывы на бактерии группы колиформных бактерий производились в жидкую среду Кода (Рисунок 10). Наличие в посевном материале лактозоположительных энтеробактерий определяется визуально по помутнению и изменению цвета среды Кода из зелёного в жёлтый. Помутнение среды без изменения цвета указывает на рост микроорганизмов не разлагающих лактозу.

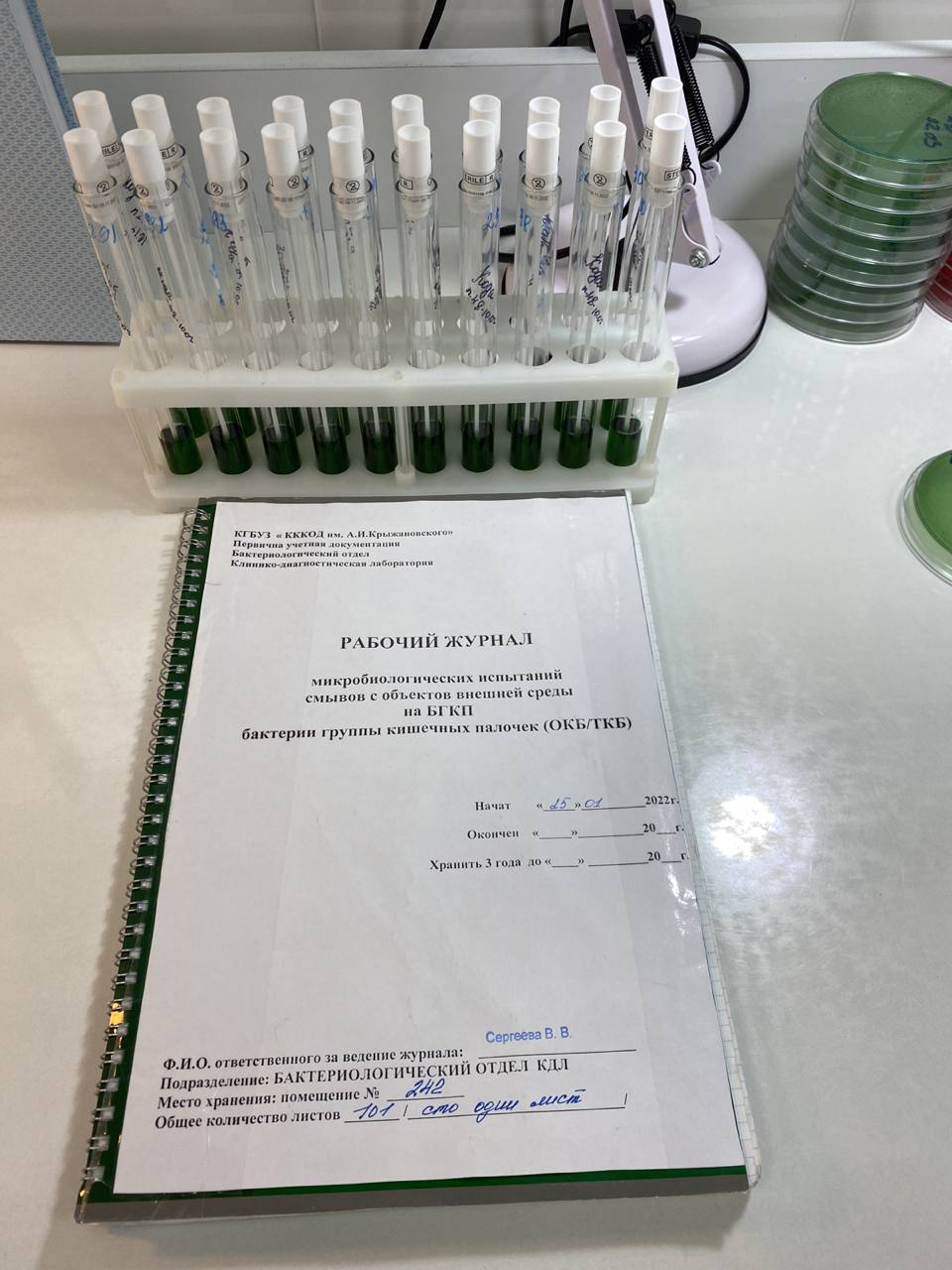


Рисунок 10 - Смывы на среду Кода

Мной были учтены результаты микробиологических испытаний смывов на бактерии группы кишечной палочки и занесены в рабочий журнал установленного образца. Среда не изменила цвет, не помутнела. Роста нет. Следовательно, БГКП не обнаружено.

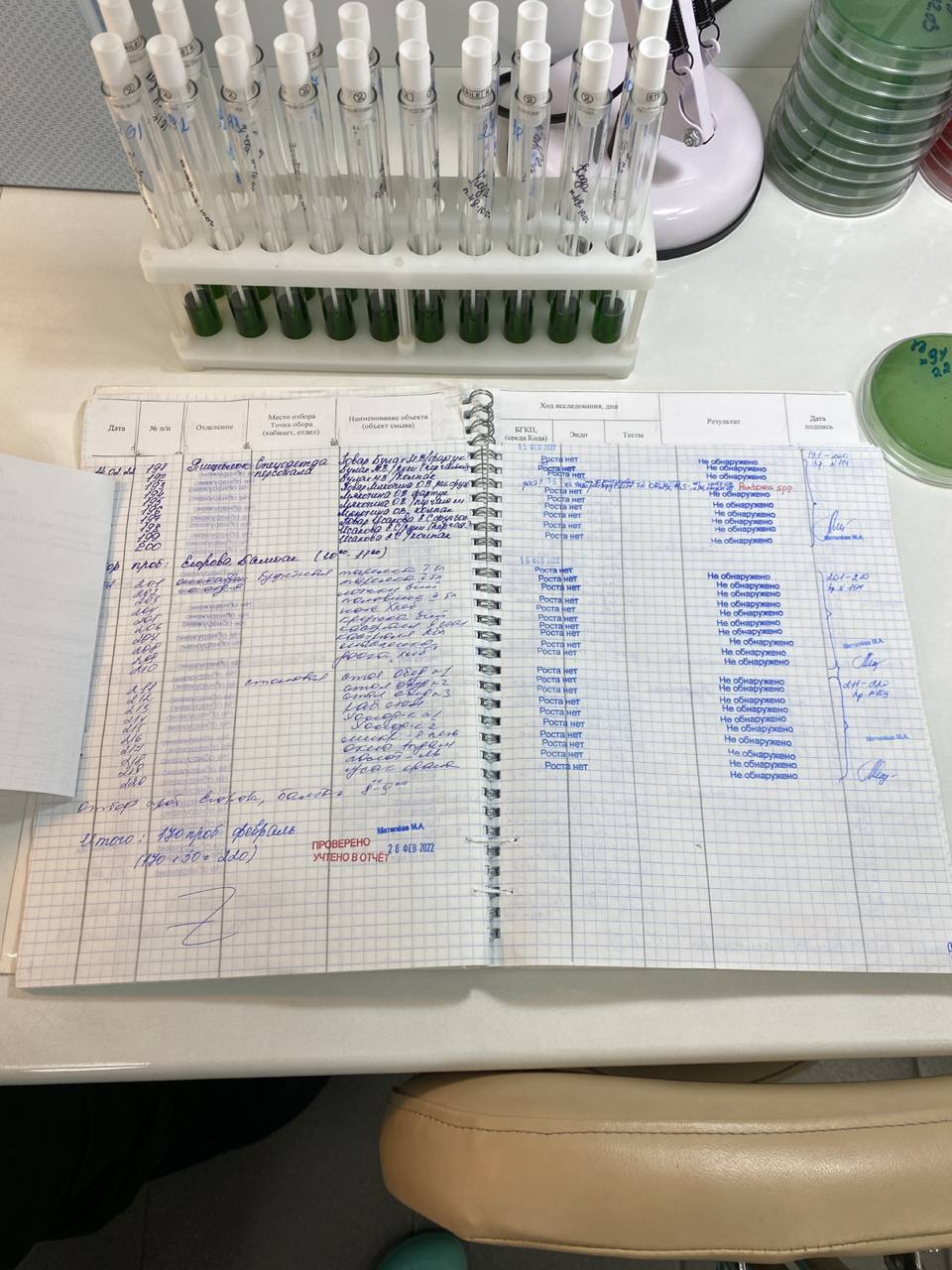


Рисунок 11 - Пример заполнения рабочего журнала

Смывы в селенитовый бульон, который подавляет рост всех бактерий кишечной группы кроме сальмонелл, предназначены для селективного накопления сальмонелл из пищевых продуктов, объектов окружающей среды и других материалов.

Селенитовый бульон не помутнел и не изменил цвет. Я пересеяла смывы на дифференциально-диагностические среды Плоскирева, висмут-сульфит агар и ксилозо-лизин-деоксихолат агар и внесла все данные в соответствующий рабочий журнал установленного образца (Рисунок 12).

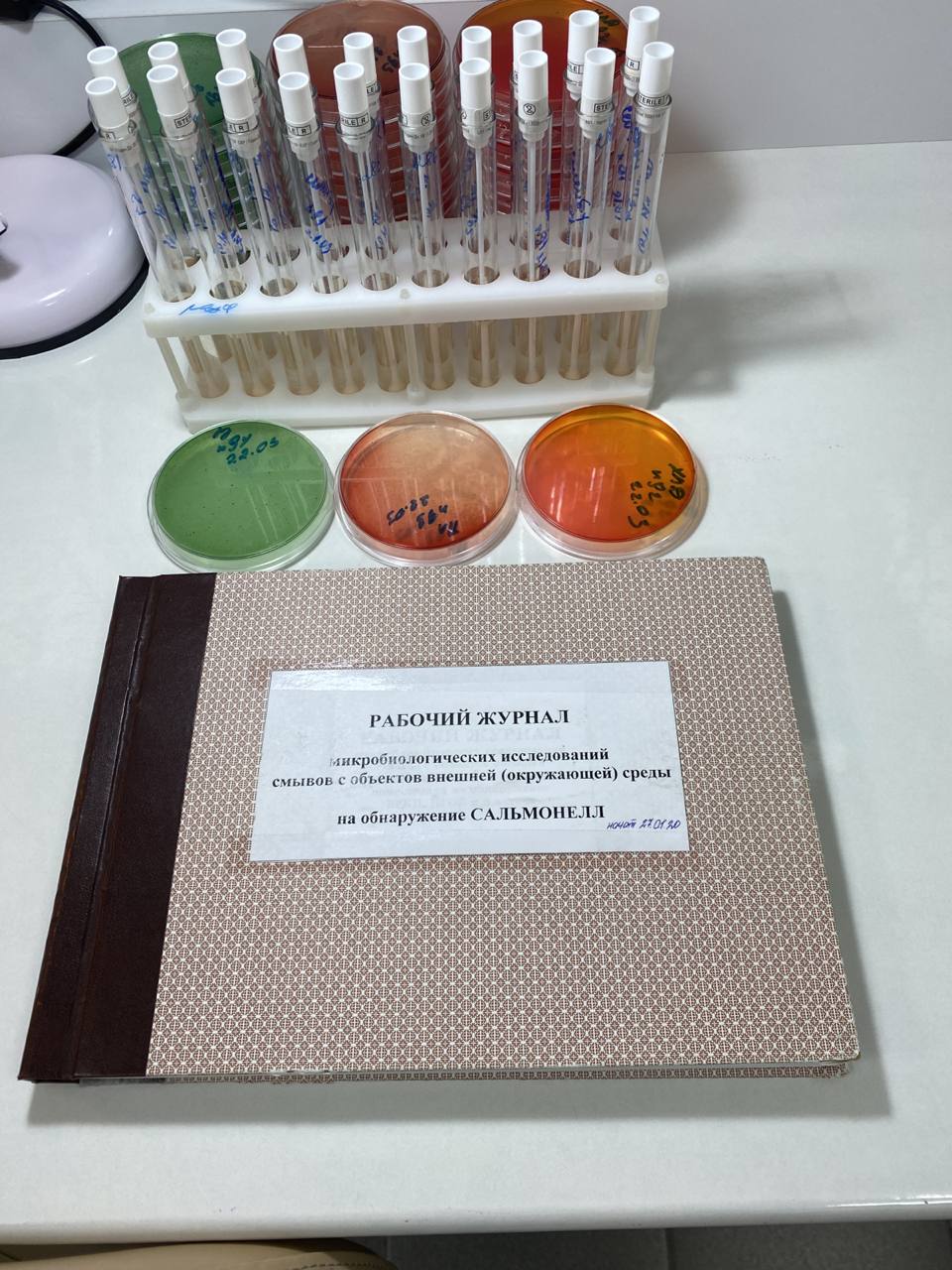


Рисунок 12 - Подготовка к пересеву на дифференциальные среды для обнаружения сальмонелл

При наличии сальмонелл на среде Плоскирева обнаружится рост бесцветных, слегка розовых колоний, иногда с чёрным центром, на висмут-сульфит агаре - чёрных (иногда зеленоватых) колоний с прокрашиванием среды под ними, а на ксилозо-лизин-деоксихолат агаре - чёрных колоний со светлым ободком (Рисунок 13).

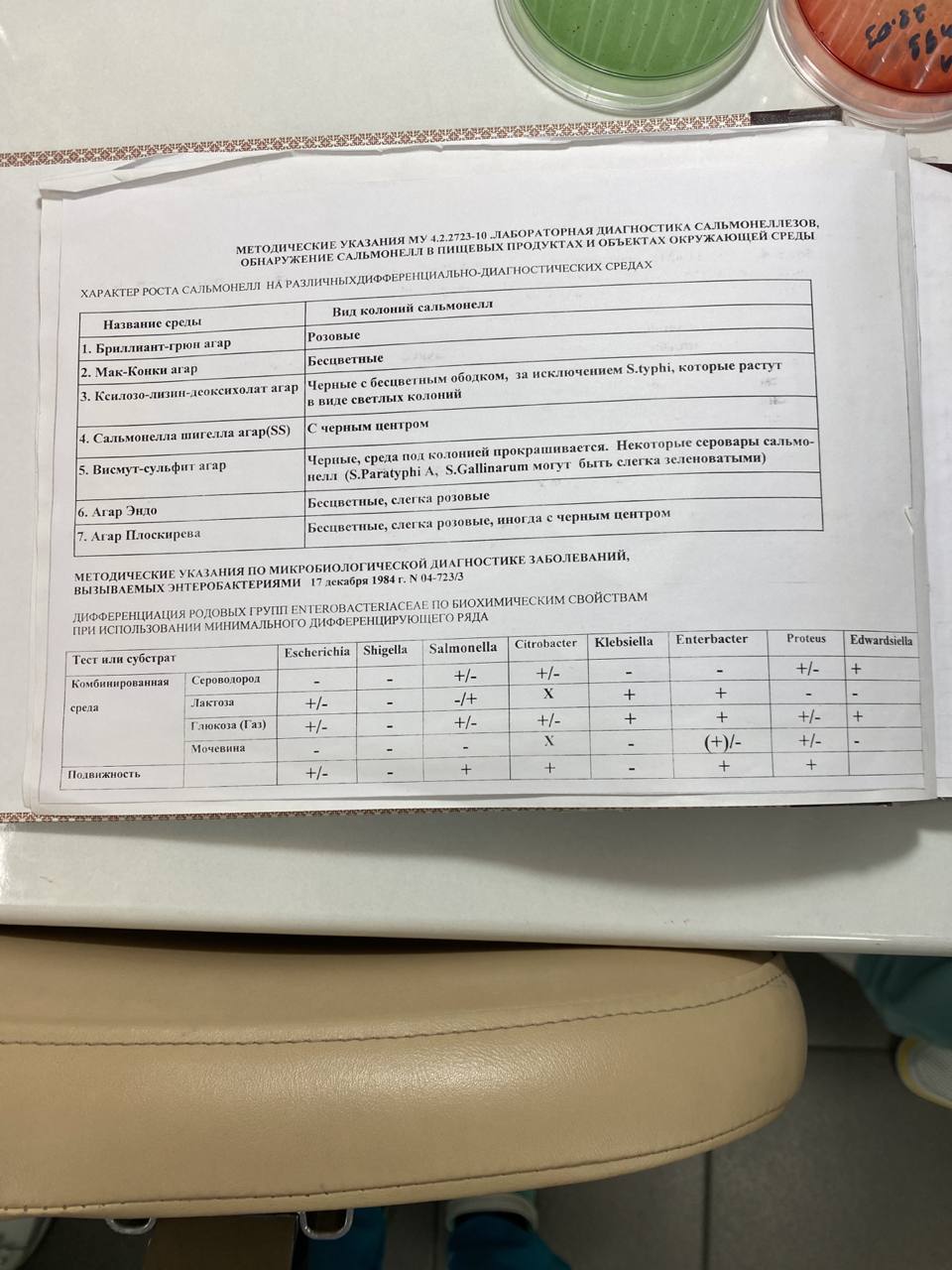


Рисунок 13 - Характер роста сальмонелл

**День 7 (26.05.2023г)**

**Второй этап исследования дисбактериоза.**

Дисбактериоз: второй день исследования.

На среде Эндо подсчитываю число и процент лактозонегативных (бесцветных) колоний по отношению ко всему числу выросших колоний. Колонии со слабовыраженными ферментативными свойствами (слабое разложение лактозы - розовые колонии) подсчитывают по отношению к общему числу колоний кишечной палочки. Например: на среде Эндо выросли 50 лактозонегативных колоний при посеве 0,1 мл фекалий из разведения 1:100000. При расчете следует 50 умножить на 10, а затем на 100000 (степень разведения). Следовательно, в 1 г фекалий будет 50000000 лактозонегативных энтеробактерий.

С чашек со средами Эндо, Левина, Плоскирева выделяют не менее 4 - 5 колоний, отличающихся по морфологии, окраске на среды Рессела с мочевиной и солью Мора или на среду Олькеницкого, а также в пробирку с бульоном, под пробку которой подвешена индикаторная бумажка для определения индола. В дальнейшем лактозонегативные культуры изучают прежде всего в отношении принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Родовой состав лактозоотрицательных энтеробактерий, не относящихся к патогенным микробам семейства кишечных, может быть определен с помощью тестов, но для выявления дисбактериоза можно не детализировать родовой состав лактозонегативных бактерий, а ограничиться определением на среде Эндо общей суммы лактозонегативных колоний.

Рост микробов рода Протея характеризуется разложением мочевины и окрашиванием среды Рессела в фиолетово-коричневый цвет при индикаторе тимоловый синий + кислый фуксин или оранжевый при индикаторе ВР, на среде Олькеницкого - в оранжевый цвет.

На 3 - 5 % кровяном агаре учитываю процентные соотношения колоний кишечной палочки, обладающих и не обладающих гемолизирующими свойствами; соотношения колоний кишечной палочки и кокковых форм; соотношения гемолизирующих и негемолизирующих кокков.

С 5 % кровяного агара пересеваю колонии разного вида на скошенную поверхность слабощелочного агара. Посев инкубирую 20 - 24 часа при 37°.

Для определения лецитиназной активности делаю посев секторами на чашку с желточно-солевым агаром (на одну чашку можно посеять 4 - 8 культур). Посев инкубирую 24 - 48 часов при 37°.

Для дифференциации энтерококка от прочих диплококков и диплострептококков применяют следующие тесты: способность расти и редуцировать метиленовую синьку в молоке, как наиболее надежный тест, рост в бульоне с 40 % желчи, расщепление маннита, терморезистентность (выживание при прогревании при 60° - 30 минут).

С целью обнаружения патогенных грибов посевы на среде Сабуро инкубируют в течение 3 - 5 дней при 28 - 30°, выделяют плотные непрозрачные колонии в пробирки со скошенной поверхностью этой же среды. Посевы снова выдерживают в термостате при той же температуре 3 - 4 суток, после чего проводят микроскопию препарата из живой культуры в капле стерильной водопроводной воды при помощи объектива 40, окуляра 10. К патогенным грибам относят культуры почкующихся клеток при наличии длинных нитей мицелия (псевдомицелий) или более коротких нитей (истинный мицелий).

Для определения анаэробных бифидобактерий посевы на среде Блаурокк выращивают при 37° в течение 48 часов.

Исследования указанных представителей кишечной микрофлоры не исчерпывает весь биоценоз кишечника, но позволяет выявить нормальное или нарушенное состояние кишечной микрофлоры.

Для количественного определения содержания кишечной палочки штамма М17 у лиц, получавших колибактерин или бификол, проводят дополнительный посев 0,1 мл из разведения 10-5 на чашку со средой Эндо, в которой 1% лактозы заменен 1% сахарозы.

**День 8 (29.05.2022г)**

**Третий этап исследования дисбактериоза.**

Дисбактериоз: третий день исследования.

Учитываю результаты тестов.

Провожу микроскопию окрашенных по Граму мазков пересеянных с 5 % кровяного агара колоний разного вида на скошенную поверхность слабощелочного. Культуры стафилококка проверяю в реакции плазмокоагуляции и в отношении лецитиназной активности на желточно-солевом агаре.

Для определения плазмокоагуляции петлю агаровой культуры стафилококка вношу в пробирку с 1 - 2 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы разведенной, 1:5. Посевы помещаю в термостат и проверяю результат через 30 минут, 2 - 4 и 24 часа. В качестве контроля ставлю пробирки с плазмой без добавления культуры и с плазмой, в которую посеян заведомо коагулирующий стафилококк. При свертывании плазма полностью уплотняется или в пробирке плавает сгусток.

Учитываю результат посевов с чашек Петри со средой ЖСА. Лецитиназоположительной считают культуру, вокруг которой образуется радужный венчик.

Учитываю тесты для дифференциации энтерококка.

Провожу микроскопию окрашенных по Граму мазков колоний со среды Сабуро и убираю чашки Петри с посевом обратно в термостат.

Учитываю результаты роста на среде Блаурокк. Из посевов, в которых виден рост в виде помутнения всей среды, в виде отдельных колоний или тяжей, готовлю окрашенные по Граму мазки. Обнаружение характерных грамположительных палочек с разветвлениями на концах, расположенных в виде римской цифры V, с несколько утолщенными концами или в виде скоплений, напоминающих китайские иероглифы, подтверждает их принадлежность к бифидобактериям. При отсутствии роста через 48 часов посевы оставляю в термостате до 72 часов.

Для количественного определения содержания кишечной палочки штамма М17 определяю процентное соотношение колоний, расщепляющих сахарозу (кишечная палочка М17 сахарозоположительная), к общему числу выросших колоний кишечной палочки. Для окончательного суждения о принадлежности выросших колоний к кишечной палочке штамма М17 необходимо испытать не менее 8 - 10 сахарозоположительных колоний в реакции агглютинации на стекле с сывороткой против кишечной палочки М17, разведенной в 10 раз. Этот тест является показателем как степени заселения кишечника штаммом М17 при приеме препарата, так и длительности приживления этого штамма после прекращения лечения колибактерином или бификолом.

Все данные заношу в журнал и сверяю с таблицей норм (Таблица 3).

Таблица 3 - Нормальная микрофлора кишечника.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Микрофлора | | Норма |
| 1. | Патогенные микробы семейства кишечных | - |
| 2. | Общее количество кишечной палочки | 300 - 400 млн/г |
| 3. | Кишечная палочка со слабовыраженными ферментативными свойствами | до 10 % |
| 4. | Лактозонегативные энтеробактерии | до 5 % |
| 5. | Гемолизирующая кишечная палочка (в %) | 0 |
| 6. | Кокковые формы в общей сумме микробов | до 23 % |
| 7. | % гемолизирующего стафилококка по отношению ко всем кокковым формам | 0 |
| 8. | Бифидобактерии | 107 - и выше |
| 9. | Микробы рода Протея | 0 |
| 10. | Грибы рода Кандида | 0 |
| 11. | Кишечная палочка М17 у лиц, леченных колибактерином, бификолом (в %) | 0 |

**День 9 (30.05.2023г)**

**Иммунодиагностика**

1. Методы проведения реакций агглютинации.

Реакция агглютинация (РА) - это склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток под действием антител в присутствии электролита (изотонического раствора натрия хлорида). Образовавшийся осадок называют агглютинатом.

Для реакции необходимы:

1. Антитела (агглютинины) - находятся в сыворотке больного или в иммунной сыворотке.

2. Антиген - взвесь живых или убитых микроорганизмов, эритроцитов или других клеток.

3. Изотонический раствор.

Реакцию агглютинации для серодиагностики широко применяют при брюшном тифе, паратифах (реакция Видаля), бруцеллезе (реакция Райта) и др. Антителом при этом является сыворотка больного, а антигеном - известный микроб.

При идентификации микробов или других клеток антигеном служит их взвесь, а антителом - известная иммунная сыворотка. Эту реакцию широко применяют при диагностике кишечных инфекций, коклюша и др.

Реакция агглютинации на стекле. На обезжиренное предметное стекло наносят 2 капли специфической (адсорбированной) сыворотки и каплю изотонического раствора. Неадсорбированные сыворотки предварительно разводят в соотношении 1:5 - 1:25. Капли на стекло наносят так, чтобы между ними было расстояние. Восковым карандашом на стекле помечают, где какая капля. Культуру петлей или пипеткой тщательно растирают на стекле, а потом вносят в каплю изотонического раствора и в одну из капель сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси. Капля сыворотки, в которую не внесена культура, является контролем сыворотки.

Реакция протекает при комнатной температуре в течение 1-3 мин. Контроль сыворотки должен оставаться прозрачным, а в контроле антигена должна наблюдаться равномерная муть. Если в капле, где культура смешана с сывороткой, появятся хлопья агглютината на фоне прозрачной жидкости, результат реакции считают положительным. При отрицательном результате реакции в капле будет равномерная муть, как в контроле антигена.

Развернутая реакция агглютинации. Готовят последовательные, чаще всего двукратные разведения сыворотки. Сыворотку больного обычно разводят от 1:50 до 1:1600, иммунную - до титра или до половины титра. Титр агглютинирующей сыворотки - ее максимальное разведение, в котором она агглютинирует гомологичные клетки.

Разведение сыворотки: 1) ставят в штатив нужное количество пробирок одинакового диаметра, высоты и конфигурации дна;

2) на каждой пробирке указывают степень разведения сыворотки, кроме того, на 1-й пробирке пишут номер опыта или название антигена. На пробирках контролей пишут "КС" - контроль сыворотки и "КА" - контроль антигена;

3) во все пробирки наливают по 1 мл изотонического раствора;

4) в отдельной пробирке готовят исходное (рабочее) разведение сыворотки. Например, для приготовления рабочего разведения 1:50, в пробирку наливают 4,9 мл изотонического раствора и 0,1 мл сыворотки. На пробирке обязательно указывают степень ее разведения. Исходное разведение сыворотки вносят в первые две пробирки и в пробирку контроля сыворотки;

5) готовят последовательные двукратные разведения сыворотки.

После того как сделаны разведения сыворотки, во все пробирки, кроме контроля сыворотки, вносят по 1-2 капли антигена (диагностикума или свежеприготовленной взвеси бактерий). В пробирках при этом должна появиться небольшая равномерная муть. Контроль сыворотки остается прозрачным.

Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат (37° С). Предварительный учет результатов реакции производят через 2 ч, а окончательный - спустя 18-20 ч (выдерживая при комнатной температуре).

Учет результатов как всегда начинают с контролей. Контроль сыворотки должен оставаться прозрачным, контроль антигена - равномерно мутным. Просматривают пробирки в проходящем с вете. При положительном результате реакции в пробирках видны зерна или хлопья агглютината. Агглютинат постепенно оседает на дно в виде "зонтика", а жидкость над осадком просветляется.

2. Методы проведения реакции преципитации.

В реакции преципитации происходит выпадение в осадок специфического иммунного комплекса, состоящего из растворимого антигена (лизата, экстракта, гаптена) и специфического антитела в присутствии электролитов.

Образующееся в результате этой реакции мутное кольцо или осадок называют преципитатом. От реакции агглютинации эта реакция в основном отличается размером частиц антигена.

Реакцию преципитации обычно применяют для определения антигена при диагностике ряда инфекций (сибирская язва, менингит и др.); в судебной медицине - для определения видовой принадлежности крови, спермы и др.; в санитарно-гигиенических исследованиях - при установлении фальсификации продуктов; с ее помощью определяют филогенетическое родство животных и растений.

В преципитационную пробирку с помощью пастеровской пипетки вносят 0,2-0,3 мл (5-6 капель) сыворотки (сыворотка не должна попадать на стенки пробирки). На сыворотку осторожно наслаивают антиген в таком же объеме, наливая его тонкой пастеровской пипеткой по стенке пробирки. Пробирку при этом держат в наклонном положении. При правильном наслаивании между сывороткой и антигеном должна получиться четкая граница. Осторожно, чтобы не перемешать жидкости, пробирку ставят в штатив. При положительном результате реакции на границе антигена и антитела образуется мутное "кольцо" - преципитат.

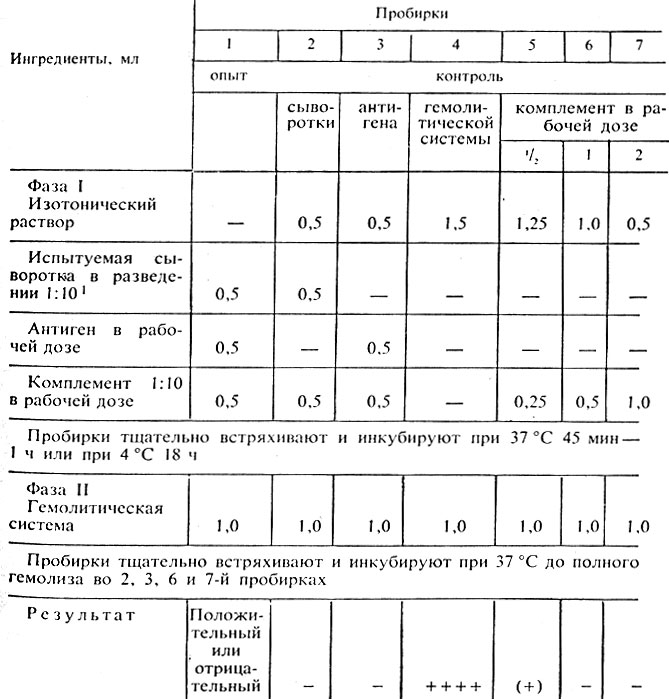
3. Методы проведения реакции связывания комплемента.

Реакция связывания комплемента (РСК) основана на том, что специфический комплекс антиген - антитело всегда адсорбирует на себе (связывает) комплемент.

Эту реакцию широко применяют при идентификации антигенов и в серодиагностике инфекций, особенно заболеваний, вызванных спирохетами (реакция Вассермана), риккетсиями и вирусами.

Проводится в 2 этапа (Таблица 4).

Таблица 4 - Схема основного опыта РСК.



4. Метод проведения реакции иммунофлюоресценции.

В реакции иммунофлюоресценции (РИФ) используют люминесцентную микроскопию для серологических исследований. Реакция основана на том, что иммунные сыворотки, к которым химическим путем присоединены флюорохромы, при взаимодействии с соответствующими антигенами образуют специфический светящийся комплекс, видимый в люминесцентном микроскопе. Метод высокочувствителен, прост, не требует выделения чистой культуры (можно обнаружить микроорганизмы непосредственно в материале от больного: кале при холере, мокроте при коклюше, мозговой ткани при бешенстве). Результат можно получить через полчаса после нанесения на препарат люминесцирующей сыворотки. Поэтому РИФ широко применяют при экспрессдиагностике ряда инфекций.

Для приготовления препаратов предметное стекло с фиксированным мазком (отпечатком, срезом) помещают во влажную камеру.

На мазок наносят каплю люминесцирующей сыворотки. Закрывают чашку и помещают в термостат или оставляют при комнатной температуре на 20-30 мин. После инкубации промывают забуференным изотоническим раствором (рН 7,4), ополаскивают дистиллированной водой, высушивают, наносят каплю забуференного глицерина, накрывают покровным стеклом (не толще 0,17 мм!) и рассматривают в люминесцентном микроскопе. Если в препарате есть микробы, гомологичные антителам люминесцирующей сыворотки, они ярко светятся на темном фоне.

Непрямой метод РИФ заключается в том, что на первом этапе препарат обрабатывают нелюминесцирующей иммунной специфической сывороткой к искомому антигену. В случае, если в препарате имеются искомые антигены (микробы), то образуется комплекс антиген - антитело, который увидеть нельзя. После высушивания, на втором этапе препарат обрабатывают люминесцирующей сывороткой, содержащей антитела не к искомому антигену, а к глобулинам того вида животного, от которого получена специфическая сыворотка. Например, если первая сыворотка получена при иммунизации кролика, то вторая должна содержать антитела к кроличьим глобулинам. Эти антитела соединяются с глобулинами специфической сыворотки, которые адсорбировались на искомом антигене, и комплекс светится при рассматривании препарата в люминесцентный микроскоп.

**День 10 (31.05.2023г)**

**Методический день**