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 »

Макина Дарья Евгеньевна

ФИО

Место прохождения практики

КГБУЗ «Красноярская межрайонная детская клиническая больница№1»

(медицинская организация, отделение)

с «9»052022 г. по «21» 052022 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) Быстрова Марина Михайловна (Старшая медсестра)

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Михайлова Юлия Александровна (Старший лаборант)

Методический – Ф.И.О. (его должность) Жукова Марина Васильевна (преподаватель)

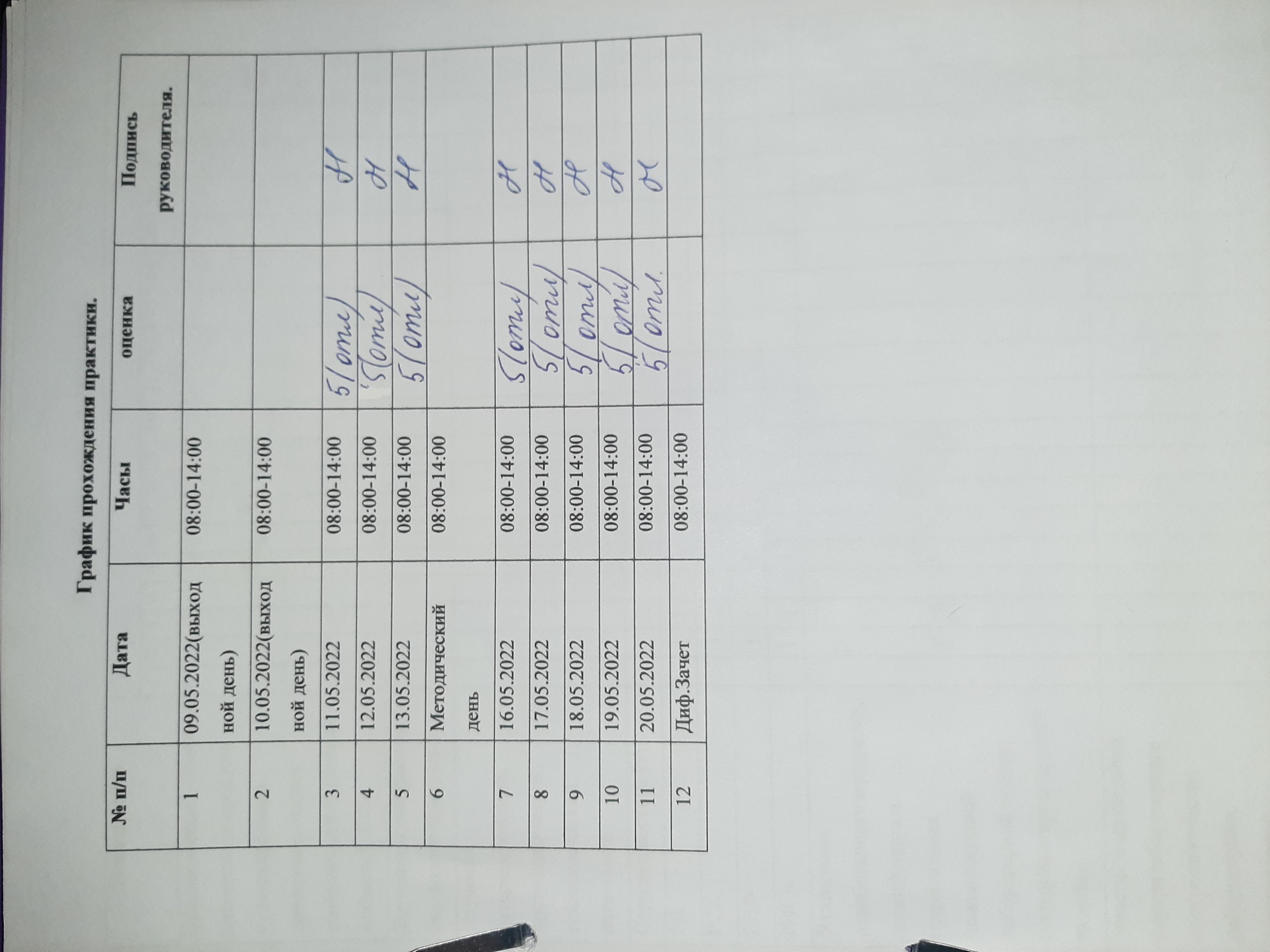
Красноярск, 2022.

**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** |

****

**Лист лабораторных исследований.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследования. |  | | | | | | | | | | | | | | | | | | итог |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ. |  | 3 | 5 | 2 | 7 | 6 | 7 | 5 | 8 | 4 | 6 | 4 |  |  |  |  |  |  | **57** |
| Изучение культуральных, морфологических св-в |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитичес кой активности |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| Серодиагностика РА |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| РП |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| РСК |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| РИФ |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| РНГА |  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |  |  |  |  |  |  | **11** |
| Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; |  | 11 | 20 | 35 | 27 | 23 | 30 | 21 | 25 | 23 | 19 | 25 |  |  |  |  |  |  | **259** |
| участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **1** |

**День 1. Ознакомление с правилами работы в бактериологической лаборатории.**

Техника безопасности

1. Перед началом работы надеть санитарно – гигиеническую одежду, приготовить средства индивидуальной защиты.
2. Работать с исследуемым материалом в резиновых перчатках, избегая углов и порезов.
3. Повреждения кожи на руках, если таковые имеются, заклеить пластырем.

При проведении бактериологических исследований необходимо соблюдать следующие правила:

* Работать с инфекционным материалом проводят с помощью инструментов (пинцеты, иглы, петли, корнцанги и пр.); запрещается прикасаться руками к исследуемому материалу;
* Посев инфекционного материала в пробирки и чашки Петри производят вблизи от огня горелки с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки;
* Платиновые тепли прокаливают на огне;
* Не допускается соприкосновение рук с конденсатом воды в засеянных чашках;
* При посеве инфекционного материала делают надпись на пробирках, чашках, колбах, флаконах и др. с указанием названия материала, номера культуры (анализа), даты посева или соответствующего регистрационного номера;
* Во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, в пробирки – в штативы. Размещение посевов патогенных бактерий непосредственно на столах не допускается;
* Переливание инфекционных жидкостей из сосуда в сосуд через край не допускается;
* По окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфекционным материалом.

Устройство лаборатории:

Бактериологическая лаборатория располагается на первом этаже инфекционной больницы. Она имеет 2 зоны – «чистую» и «заразную». В «чистой» зоне располагается: комната для спецодежды, кабинет руководителя, моечная, средоварочная, кабинет для разлива питательных сред. В «заразной» зоне располагаются: стойка регистрации материала, лабораторные комнаты для работы с материалом, автоклавная.

Нормативные документы:

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-Эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»
2. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий"

**День 2. (12.05.2022). Подготовка материала к микробиологическому исследованию: прием, регистрация биоматериала.**

Прием биоматериала: биоматериал доставляется в лабораторию в контейнерах не позднее двух часов после взятия. Материал должен доставляться в соответствии с температурным режимом (не менее 35ºС). К биоматериалу прилагаются бланки, где указаны: источник и метод получения биологического материала, дату и время его взятия, ФИО, пол и возраст больного, название учреждения, отделения, № палаты, пред­полагаемый диагноз инфекционной патологии и предшествующую антибактериальную терапию, фамилию и подпись врача, направившего материал для проведения бактериологического исследова­ния.

Регистрация материала: лаборант просматривает материал и расставляет его по порядку для удобства регистрации его в журнал. К каждому направлению приписывается номер материала, в соответствии с номером в журнале. В журнале следует записывать все необходимые сведения о пациентах и результаты лабораторных анализов. Это дает возможность проверить результаты и провести контроль качества. Включаются следующие сведения:

1. имя пациента + уникальный идентификационный номер, или идентификатор, (например, номер социального страхования (если применимо) или дата и место рождения и т. п.);
2. лабораторный идентификатор пациента
3. контактная информация лица, запрашивающего анализ
4. тип первичной пробы
5. дата взятия пробы
6. дата получения пробы
7. дата приема пробы
8. запрашиваемые исследования
9. результаты исследований + имя сотрудника, проводившего исследования
10. дата выдачи отчета
11. данные лица, отправившего отчет

**День 3. (13.05.2022). Приготовление сред.**

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среды должны создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов.

Среды должны соответствовать следующим требованиям:

1. Быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей.
2. Иметь оптимальную концентрацию водородных ионов — рН
3. Быть изотоничными для микробной клетки; т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.
4. Быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);
5. Плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;
6. Обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом
7. Быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

Классификация сред:

1. Твердые (в состав сред входит агар);
2. Жидкие (в состав сред входит бульон);
3. Полужидкие (в состав сред входит и агар и бульон).

Классификация сред по назначению:

1. Универсальные (основные)среды. Эти среды используют для культивирования большинства относительно неприхотливых микроорганизмов или применяют в качестве основы для приготовления специальных сред, добавляя к ним кровь, сахар, молоко, сыворотку и другие ингредиенты, необходимые для размножения того или иного вида микроорганизмов. К этой группе относятся: МПБ, МПА, МПЖ.
2. Среды обогащения. Многие микроорганизмы не растут на обычных средах, поэтому для повышения питательной ценности среды в нее добавляют углеводы (сахарный бульон или агар) или белки (сывороточный агар и бульон, кровяной агар и бульон). Кровяной агар или кровяной бульон — получают путем добавления к питательной среде 5-10% подогретой стерильной дефибринированной крови барана, кролика, лошади, человека.
3. Элективные (избирательные) среды. Эти среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида из материала, содержащего несколько видов микробов. При посеве на них материала, содержащего смесь различных микроорганизмов, раньше всего будет проявляться рост того вида, для которого данная среда будет элективной.
4. Дифференциально-диагностические среды -  применяют для дифференцировки одного вида микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида микроорганизмов, основываясь на особенностях его обмена веществ.
5. Консервирующие среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов. Пример такой среды - глицериновая смесь, используемая для сбора испражнений при исследованиях, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий

Для приготовления сред сначала читают этикетку банки и определяют какой будет среда, жидкой, твердой или полужидкой. Затем рассчитывают количество навески для приготовления необходимого объема среды. После всех расчетов лаборант в тару наливает необходимое количество дистиллированной воды. Воду отмеряют мерным стаканом на уровне глаз по нижнему мениску. Затем на заранее подготовленных весах отмеряют раннее рассчитанную навеску и переносят ее в тару с водой. На раскаленную плиту ставят среду вариться до закипания. Кипятят 1-2 минуты, для того чтобы все вещества смогли хорошо раствориться.

После снятия среды с плиты, ее переливают во флаконы для дальнейшей стерилизации в автоклаве. В автоклаве простые среды стерилизуют при 120ºС 15 минут, среды, содержащие углеводы стерилизуют при 110ºС 20-30 минут.

После стерилизации среда должна остыть до 45-50 ºС (для предотвращения появления конденсата, свертывания добавляемых веществ) и только потом ее разливают по чашкам Петри или в пробирки.

**День 4, 5. Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (гнойно-воспалительных).**

Кокки широко распространены в природе. Они обитают на слизистых и кожных покровах, на растениях, в молочной железе, высокоустойчивы к неблагоприятным факторам и чувствительны к анилиновым красителям. Кокки обладают токсичностью. Некоторые из них, особенно стафилококки, являются условно-патогенными. Они обладают органотропностью.

По классификации Берджи (1974) кокки относятся к трем семействам: Micrococcaceae (микрококки, стафилококки, тетракокки, сардины), Streptococcaceae (стрептококки, пептострептококки) и Neis- seriaceae (нейссерии, вейлонеллы).

Выделение и идентификация стафилококков.

**Род Staphylococcus.**

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

**Морфология.** Имеют вид круглых шаров диаметром 0,5-1,5 мкм. Образуют скопления в виде грозди винограда, в гное встречаются единичные и парные кокки. Неподвижны, нет спор, при специальных условиях культивирования образуют микрокапсулу, грамположительны.

**Культивирование и культуральные свойства.** факультативные анаэробы, растут и размножаются на простых питательных средах, оптимальная температура 37 градусов, рН= 7,2 – 7,4, образуют колонии: круглые, блестящие, жёлтого цвета, цвет колонии образуется за счет стафилококкового пигмента. На МПА колонии имеют цвет от белого до желтого и ярко оранжевого. На ЖСА вокруг роста культуры образуется «радужный венчик» с перламутровым оттенком. На кровяном агаре видны зоны полного гемолиза.

**Ферментативные свойства** Сахаролитические ферменты, выражены слабо расщепляют: манит до кислоты. Протеолитические свойства: разжижают желатин, растворяют козин и другие белковые субстраты.

**Материал для исследования -** Гной. Слизь из зева, мокрота, моча, дуоденальное содержимое, кровь, рвотные массы, промывные воды желудка, пищевые продукты, слизь из носа.

**Ход исследования**

Первый день. Отделяемое слизистой оболочки засевают на ЖСА и кровяной агар. Посевы убирают в термостат.

Второй день Посевы на плотных и жидких питательных средах вынимают из термостата и изучают. Подозрительные в отношении стафилококка колонии, выросшие на ЖСА, отсевают на скошенный агар для получения и дальнейшего изучения чистой культуры. При этом учитывают наличие лецитиназы, проявляющиеся в образовании радужного венчика вокруг колонии.

Чашки с оставшимися колониями оставляют на 2-3 дня при комнатной температуре для выявления пигмента. Просматривают посевы на чашках с агаром, содержащим кровь. Колонии с четкой зоной гемолиза (просветление) вокруг них выделяют на скошенный агар. Посев крови в сахарном бульоне инкубируют 10 сут, производя через 2-3 дня высевы на агар с кровью и ЖСА.

При отсутствии роста на плотных питательных средах делают высев из бульона с глюкозой на агар с кровью. Посевы ставят в термостат на сутки.

Третий день. Вынимают посевы из термостата. Из выделенных на скошенный агар культур делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамположительных стафилококков проводят дальнейшее изучение выделенной культуры:

а) ставят реакцию плазмокоагуляции;

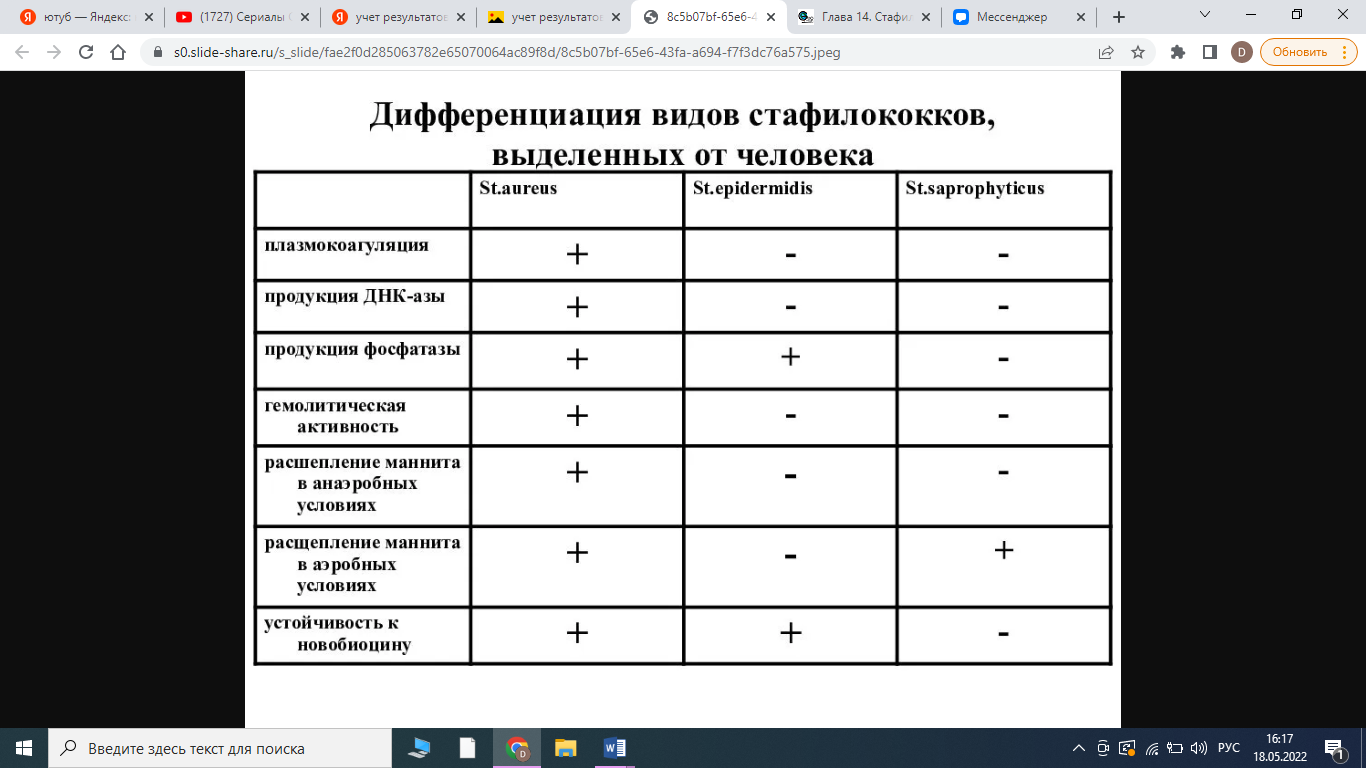
б) изучают гемолитические свойства;

в) определяют продукцию ДНКазы;

г) определяют ферментацию маннита в анаэробных условиях;

д) определяют устойчивость к новобиоцину.

Четвертый день. Учет результатов.



**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ STREPTOCOCCUS PYOGENES (ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ)**

**Морфология.** Кокки, имеющие шаровидную форму. Диаметр каждого кокка в среднем 0,6-1 мкм, характерен полиморфизм: встречаются мелкие и крупные кокки, строго шаровидные и овальные. Стрептококки располагаются цепочкой. На плотной питательной среде цепочки обычно короткие, на жидких - длинные. Неподвижны, нет спор. Свежевыделенные культуры иногда образуют капсулу. Грамположительны.

**Культивирование.** Факультативные анаэробы. Растут при температуре 37° С и рН среды 7,6-7,8. Оптимальные среды, содержащие кровь или сыворотку крови. На плотных питательных средах колонии мелкие, плоские, мутные, сероватого цвета. На агаре с кровью некоторые разновидности стрептококков образуют гемолиз. β-Гемолитические стрептококки образуют четкую зону гемолиза, α-гемолитические стрептококки образуют небольшую зеленоватую зону. Встречаются стрептококки, не дающие гемолиза.

**Ферментативные свойства.** Расщепляют глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит (не всегда) и мальтозу с образованием кислоты. Свертывают молоко, желатин не разжижают. **Материал для исследования** Слизь из зева (ангина, скарлатина). Соскоб с пораженного участка кожи (рожа, стрептодермия). Гной (абсцесс). Моча (нефрит). Кровь (подозрение на сепсис; эндокардит).

**Ход исследования**

Первый день. Делают посев на 5% агар с кровью. Микроскопируют и убирают посев в термостат.

Второй день. Вынимают чашки из термостата и просматривают. При наличии подозрительных колоний из части их делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении в мазке стрептококков часть оставшейся колонии пересевают в пробирки на агар с сывороткой для выделения чистой культуры и на бульон с кровью в пробирках. К концу дня 5-6-часовую культуру из бульона или агара пересевают на бульон Мартена с 0,25% глюкозы для определения серологической группы в реакции преципитации по Ленсфильд. Пробирки и флаконы помещают в термостат и оставляют до следующего дня.

Третий день. Вынимают посевы из термостата, проверяют чистоту культуры на скошенном агаре, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

При наличии чистой культуры стрептококка производят посев на среды Гисса (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу и маннит), молоко, желатин, 40% желчь и ставят в термостат.

Просматривают бульон Мартена. При наличии специфического роста ставят реакцию преципитации по Ленсфильд для определения серологической группы.

Четвертый день. Производят учет результатов.



**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE (ПНЕВМОКОКК)**

**Морфология.**  Пневмококк - это диплококки, имеют ланцетовидную форму. Размер 0,75-0,5 × 0,5-1 мкм, располагаются они парами. В жидких средах образуют короткие цепочки. Неподвижны, нет спор, грамположительные в организме образуют капсулу. При росте на искусственных питательных средах утрачивают капсулу. В старых культурах встречаются грамотрицательные бактерии.

**Культивирование**. Факультативные анаэробы. Растут при температуре 36-37° С и рН среды 7,2-7,4. Растут только на средах с добавлением нативного белка. На агаре с сывороткой образуют мелкие, нежные, прозрачные колонии. На агаре с кровью вырастают влажные колонии зеленовато-серого цвета, окруженные зеленой зоной. Растут в бульоне с добавлением 0,2% глюкозы и в бульоне с сывороткой. Рост в жидких средах с диффузным помутнением и пылевидным осадком на дне.

**Ферментативные свойства**. Расщепляют лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, инулин с образованием кислоты. Молоко свертывают, желатин не разжижают, индол не образуют, растворяются в желчи, расщепляют инулин. **Материал для исследования** Мокрота (пневмония). Слизь из зева (ангина). Отделяемое из язвы (ползучая язва роговицы). Выделение из уха (отит). Гной (абсцесс). Плевральный пунктат (плеврит). Кровь (подозрение на сепсис).

**Ход исследования**

Первый день. Мокроту выливают в чашку Петри, петлей захватывают слизисто-гнойный комочек, растирают на предметном стекле, высушивают, красят по Грамму имикроскопируют. Мокроту сеют на чашки с кровяным агаром. При подозрении на сепсис кровь засевают в сахарный бульон, из него выросшую культуру засевают на кровяной агар. Слизь из зева, отделяемое язвы и выделения из уха сеют на кровяной агар и заражают мышей. Гной при открытых и закрытых абсцессах – тампоном собранный материал засевают на кровяной агар. Затем прополаскивают в 1-2 мл стерильного бульона и по 0,5 мл вводят 2-3 мышам. Плевральный пунктат – материал центрифугируют, осадок засевают в бульон с сывороткой и на агар с сывороткой в чашках Петри.

Второй день. Посевы вынимают из термостата, просматривают и из подозрительных колоний делают мазки. При наличии в мазках грамположительных ланцетовидных диплококков 2-3 колонии выделяют на скошенный агар с сывороткой для получения чистой культуры. Посевы помещают в термостат. Из бульона делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Третий день. Посевы вынимают из термостата. Проверяют чистоту культуры - делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии в выделенной культуре грамположительных ланцетовидных диплококков проводят идентификацию выделенной культуры путем посева:

1) на среды Гисса (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза) проводят посев обычным способом - уколом в среду;

2) на среду с инулином;

3) на среду с оптохином;

4) ставят пробу с желчью.

Четвертый день.Учет результатов.

Образует α-гемолиз, в мазке диплококки ланцетовидной формы, сахарный бульон -, придонно-пристеночный рост. Лактоза+, Глюкоза+, Сахароза+, Мальтоза+, 40% желчь-лизис. Оптохин-.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕНИНГОКОККОВ (N. Meningitidis)**

**Морфология.** Парные кокки, состоящие из двух бобовидных кокков. Размер каждого кокка 0,6-0,8 × 1,2-1,5 мкм. Полиморфны. Неподвижны, нет спор, образуют капсулу. Грамотрицательны. В чистых культурах располагаются тетрадами, а в мазках, из спинномозговой жидкости, чаще располагаются попарно. В гнойном материале находятся внутри лейкоцита.

**Культивирование.** Аэробы. Размножаются только на средах, содержащих нативный белок. Растут при температуре 36-37° С, рН среды 7,4-7,6. На плотных средах образуют небольшие 2-3 мм в диаметре, нежные, полупрозрачные, голубоватые, вязкие колонии. В бульоне с сывороткой дают легкую муть и небольшой осадок. Свежевыделенные штаммы в S-форме. Старые культуры могут образовывать шероховатые R-формы колоний.

**Ферментативные свойства**. Они расщепляют глюкозу и мальтозу с образованием кислоты. Не створаживают молоко, желатин не разжижают.

**Материал для исследования** Спинномозговая жидкость. Отделяемое слизистой оболочки носоглотки. Кровь.

**Ход исследования**

Первый день. Спиномозговую жидкость центрифугируют. Одну каплю осадка засевают на агар с сывороткой в чашки Петри. Кровь и слизь из носоглотки так же засевают в чашки Петри и убирают в термостат при 37 градусах.

Второй день. Вынимают из термостата чашки Петри, просматривают их. При наличии подозрительных колоний, 2-3 колонии выделяют на чашку Петри с сывороточным агаром для получения чистой культуры.

Третий день. На поверхности агара с сывороткой менингококки дают серовато- белый налёт. Для определения чистоты культуры мазки окрашивают по Граму и микроскопируют. Делают посев на среды Гисса с 0,25% сывороткой, ставят пробу на наличие оксидазы: для этого на место скопления колоний наносят каплю диметилпарафенилендиамина. При наличии фермента оксидазы колонии приобретают розовую окраску.

Четвёртый день. Производят учёт результатов.

Мальтоза+, Глюкоза+, Лактоза-, Сахароза-, Оксидаза+.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГОНОКОККОВ (N. meningitidis)**

**Морфология.** Гонококки - это диплококки, состоящие из двух бобовидных кокков, лежащих вогнутыми сторонами друг к другу (напоминают кофейные зерна). Размер гонококков 1,2-1,3 × 0,7-0,8 мкм. Они полиморфны. Гонококки неподвижны, спор нет. В патологическом материале (гное) обнаруживают капсулообразное вещество. Грамотрицательны. Под влиянием лекарственных и других веществ быстро изменяются: появляются грамположительные формы. В патологическом материале располагаются внутриклеточно (в лейкоците), но могут быть вне клетки.

**Культивирование.** Аэробы. Растут на средах, содержащих нативный белок (человеческий) - кровь, сыворотку, при температуре 37° С и рН среды 7,2-7,4.. На сывороточной среде гонококки образуют мелкие колонии 1-2 мм, прозрачные, блестящие с ровными краями, напоминающие капельки росы. На кровяной среде гемолиза не дают. В сывороточном бульоне они дают слабое помутнение и пленку, которая оседает на дно пробирки.

**Ферментативные свойства.** Гонококки расщепляют только один сахар - глюкозу с образованием кислоты. Протеолитических свойств нет.

**Материал для исследования** Отделяемое слизистой оболочки уретры у мужчин. Отделяемое слизистой оболочки уретры и шейки матки у женщин. Гнойные выделения из глаз. Кровь для получения сыворотки.

**Ход исследования**

Первый день. Из собранного материала делают мазки и окрашивают по граму. В положительных результатах в препарате цвет клеточных элементов окрашены в фиолетовый цвет, а оранжево- красные гонококки расположены в лейкоцитах и обычно скоплениями вне их. Хроническая форма. Когда с помощью микроскопа гонококка выявить не удаётся, что бывает чаще всего при хронических формахзаболевания, производят посев на питательные среды. Посевы инкубируют при 37 градусах.

Второй день. Вынимают посевы из термостата и просматривают их. Изучают колонии. Делают мазки. При наличии подозрительных грамотрицательных диплококков колонии пересевают на скошенную среду в пробирках (среда должна быть свежеприготовленной и содержать достаточное количество конденсата) и ставят пробу на оксидазу. Для этого пипеткой на колонию наносят каплю 1% раствора диметилпарафенилендиамина, колонии изменяют цвет от темно-коричневого до черного.

Третий день. Вынимают посевы из термостата, делают мазки со скошенного агара, окрашивают по Граму и микроскопируют. Засевают на среды Гисса (лактозу, глюкозу, маннит и мальтозу). Эти углеводы должны содержать 30% сыворотки крови. Засеянные пробирки ставят в термостат.

Четвертый день. Вынимают пробирки из термостата, при отсутствии роста оставляют их в термостате еще на 1-2 дня. При наличии роста учитывают результаты.

Глюкоза+, Мальтоза-, Лактоза-, Сахароза-.

**День 6, 7. Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (кишечные инфекции).**

Семейство Enterobakteriaceae включает в себя многочисленных представителей, имеющих общее местообитание – кишечник.

Энтеробактерии делят на:

1. патогенные (шигеллы, сальмонеллы, эшерихии, иерсинии и др.)
2. условно-патогенные (37 родов)

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕБСИЕЛЛ**

Сем.-Enterobacteriaceae

Род- Klebsiella

Вид -K. pneumoniae, K. rinoscleromatis, K. ozaenae

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

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

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

**Материал для исследования** Мокрота. Слизь из зева, гной из уха, отделяемое раны. Испражнения. Смывы с предметов окружающей среды.

**Ход исследования**

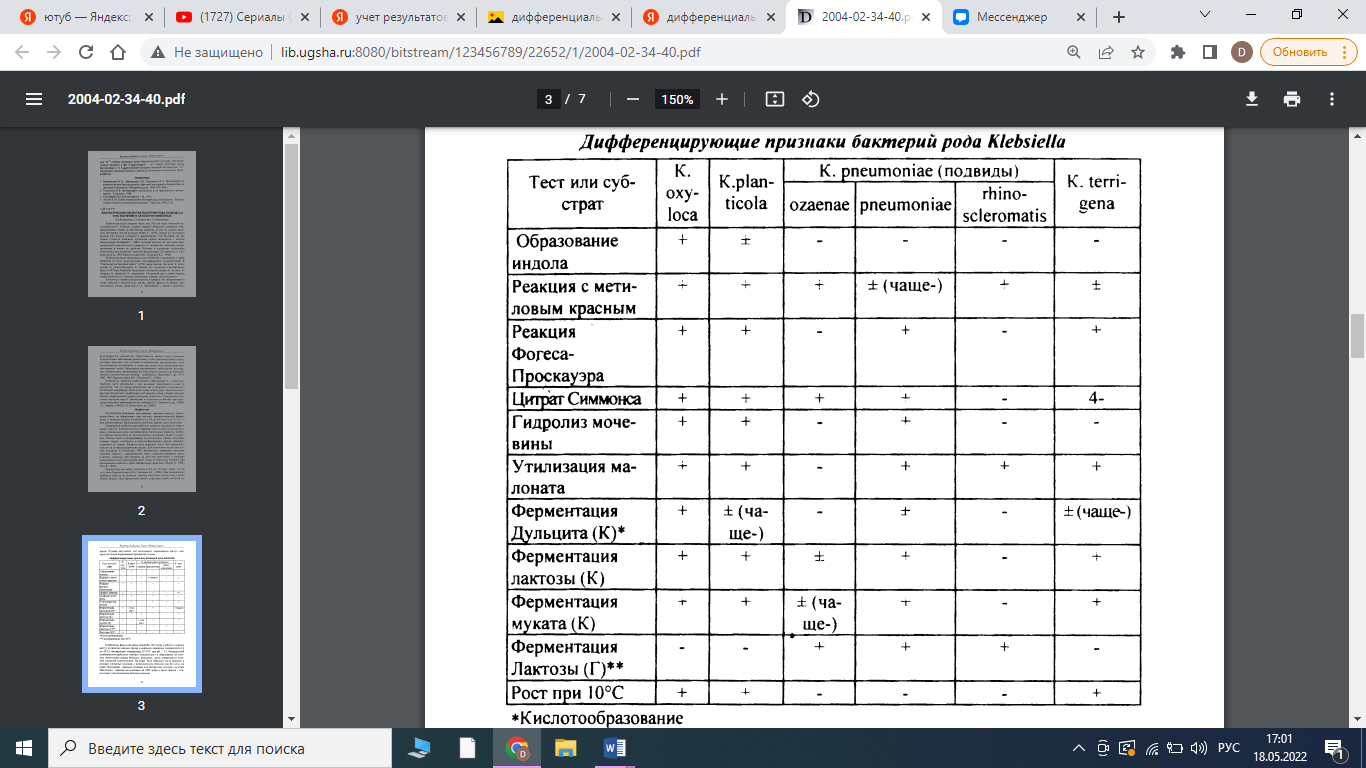
Первый день. Исследуемый материал засевают на чашки Петри с МПА, средой Эндо и Плоскирева, глюкозный бульон. Помещают в термостат.

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

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

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

Четвертый день. Производят учет результатов посева на среду с цитратом, малонатом (рост) и другими углеводами (типа Рассела или Олькеницкого). Выдают окончательный ответ.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕЯ**

Сем.-Enterobacteriaceae

Род- Proteus

Вид -P. vulgaris, P. mirabilis, P. morgani

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

**Культивирование.** Факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах при 20-37° С. Некоторые виды дают ползучий рост на плотной питательной среде, а при посеве в конденсационную воду скошенного агара - рост по всей поверхности среды.

**Материал для исследования** Испражнения. Рвотные массы. Моча. Слизь из зева, гной из уха, отделяемое раны. Секционный материал. Смывы с предметов окружающей среды.

**Ход исследования**

Первый день. Исследуемый материал засевают на чашки Петри со средой Эндо и Плоскирева. Помещают в термостат. Второй день. Отмечают характер роста на питательных средах (роение - вуалеобразный налет). Выделяют отдельные колонии или часть сплошного роста на комбинированную среду Рассела (с мочевиной) или среду Олькеницкого, делают посев в конденсационную воду пробирки со скошенным агаром (по Шукевичу).

Третий день. Делают мазок и окрашивают его по Граму. При наличии грамотрицательных мелких палочек учитывают характер роста на среде Рассела или Олькеницкого и наличие роста в пробирке с посевом по Шукевичу. Протей не ферментирует лактозу, сбраживает глюкозу с образованием газа, большей частью гидролизует мочевину. В пробе по Шукевичу - рост по всей поверхности скошенного агара. Производят посев на дополнительные среды "пестрого ряда": маннит, бульон (для определения индолообразования и образования сероводорода вкладывают в пробирку бумажки, смоченные соответствующими реактивами), полужидкий агар, желатин. Делают посев на среду с аминокислотой фенилаланином.

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

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ**

Сем.-Pseudomonadoceae

Род- Pseudomonas

Вид –Ps. aeruginosa

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

**Культивирование.** Строгие аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах. Оптимальная температура роста 37° С, но могут расти и при 5-42° С. На МПА образуют колонии размером 2-5 мм, круглые, полупрозрачные, голубовато-серые с перламутровым оттенком; на МПБ дают помутнение и образуют пленку.Характерным признаком является пигменто- и ароматообразование. Большинство штаммов образует сине-зеленый пигмент - пиоцианин, окрашивающий питательную среду. Почти все штаммы P. aeruginosa имеют характерный запах жасмина.

**Ферментативные свойства**. Ферментирует только глюкозу. Разжижает желатин и свернутую сыворотку, свертывает молоко. Дает положительную реакцию на цитохромоксидазу.

**Материал для исследования** Слизь из зева и носа, отделяемое раны. Кровь. Моча. Секционный материал. Смывы с предметов окружающей среды и рук персонала.

**Ход исследования**

Первый день. Отделяемое ран, слизь из зева и носа, моча, секционный материал сеют на питательный агар и бульон. Кровь сеют во флаконы с питательным агаром и сахарным бульоном. Смывы с предметов и рук сеют в пробирки с бульоном.

Второй день. Просматривают чашки и пробирки с посевами. Отбирают чашки, в которых среда окрашена в синевато-зеленоватый цвет и имеет запах жасмина (земляничного мыла). Дают ориентировочный ответ: "Выделена культура P. aeruginosa". Выделяют колонии на пробирки с лактозой и на пробирки со скошенным агаром. Заливают вазелиновым маслом.

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

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

Четвертый день. По совокупности всех признаков: наличие сине-зеленого пигмента, запах жасмина, грамотрицательные палочки, отсутствие расщепления лактозы в анаэробных условиях, положительная проба на цитохромоксидазу выдают ответ: "Выделена культура P. aeruginosa".

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭШЕРИХИЙ**

Сем.-Enterobacteriaceae

Род- Escherichia

Вид –E. coli

**Морфология.**  E. coli - короткие, в среднем 0,5-3,0 × 0,5-0,8 мкм палочки. Грамотрицательны. В большинстве случаев они подвижны, перитрихи. Некоторые варианты неподвижны. Многие штаммы образуют капсулу. Спор нет.

**Культивирование.** Факультативный анаэроб. Хорошо растет на простых питательных средах при 37° С и рН среды 7,2-7,8. На МПА кишечная палочка образует мутноватые, слегка выпуклые влажные колонии с ровным краем. На МПБ дает равномерное помутнение. Культуры, имеющие капсулу, растут в виде слизистых колоний. Для идентификации эшерихий используют Эндо и агар с эозинметиленовым синим (ЭМС). На среде Эндо кишечная палочка растет в виде малиново-красных колоний с металлическим блеском или без него. На среде ЭМС - в виде темно-фиолетовых колоний.

**Ферментативные свойства**. Расщепляют лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу и другие углеводы и спирты с образованием кислоты и газа. Протеолитические свойства: образуют индол. Желатин не расщепляют. Отдельные биовары не ферментируют лактозу и сахарозу

**Материал для исследования** Испражнения. Рвотные массы.

**Ход исследования**

Первый день. Испражнения и рвотные массы засевают на среду Эндо или ЭМС с помощью шпателя. Посев производят на 2-3 чашки, набирая для каждой чашки заново. Посевы помещают в термостат.

Второй день. Вынимают из термостата засеянные накануне чашки и просматривают их в падающем или проходящем свете. При наличии малиново-красных колоний на среде Эндо (с металлическим блеском или без него) или фиолетовых на среде ЭМС ставят пробную РА на стекле для дифференциации ЭПКП от других разновидностей эшерихий. Для постановки пробной РА отбирают не менее 10 изолированных колоний, отмечая или нумеруя их на обратной стороне чашки; часть каждой намеченной колонии снимают петлей и агглютинируют в капле поливалентной сыворотки или иммуноглобулина.

Испытывают только часть колонии, чтобы в случае положительной РА можно было из оставшейся части колонии выделить чистую культуру. Типовые или поливалентные эшерихиозные сыворотки изготовляют в производственных условиях. Поливалентные эшерихиозные ОК-сыворотки содержат антитела к нескольким О- и К-антигенам эшерихий. С их помощью ориентировочно определяют принадлежность выделенной культуры к ЭПКП.

Третий день. Вынимают из термостата посевы и просматривают их. На МПА энтеропатогенные кишечные палочки образуют обычно влажный, блестящий, сероватый налет, реже он бывает мутным. Выросшую на скошенном агаре культуру проверяют повторно в реакции агглютинации на стекле с поливалентными эшерихиозными сыворотками. Если выделенная культура дает реакцию агглютинации с поливалентной сывороткой, то ее агглютинируют с каждой типовой сывороткой раздельно в разведении 1:5 - 1:10. Агглютинация с живой культурой имеет ориентировочное значение.

При ферментации сахаров реакция среды становится кислой и цвет индикатора изменяется. Если, помимо кислоты, образуется газ, в среде появляются пузырьки. Одновременно определяют подвижность бактерий: делают посев в полужидкий агар уколом. Подвижные бактерии дают помутнение всей среды, неподвижные - растут только по уколу.

Четвертый день. Производят учет изменений сред Гисса, регистрируют образование индола и сероводорода. Большинство представителей эшерихий ферментирует углеводы с образованием кислоты и газа, расщепляет белковый питательный субстрат до образования индола. Учет пробирочной РА проводят при помощи лупы или агглютиноскопа. Агглютинация с живой культурой крупнохлопчатая, с убитой - мелкозернистая. Реакцию считают положительной, если агглютинация с гретой культурой отмечается в разведении сыворотки не ниже половины титра сыворотки, а живая культура агглютинируется сывороткой, разведенной не менее чем 1:200.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ**

Сем.-Enterobacteriaceae

Род- Salmonella

Вид –S. typhi, S. paratyphi

**Морфология**. Мелкие, 1,0-3,0 × 0,6-0,8 мкм палочки с закругленными концами. Грамотрицательны. Подвижны, перитрихи. Спор и капсул нет.

**Культивирование.** Факультативные анаэробы. Хорошо растут на МПА и МПБ при 37° С и рН среды 7,2-7,4. На МПА образуют нежные, полупрозрачные, слегка выпуклые, блестящие колонии, в МПБ - равномерное помутнение. При первичном посеве материала от больных часто отмечают медленный рост сальмонелл. Для их накопления производят посев на среды обогащения: селенитовый бульон, среду Мюллера, среду Кауфмана. Используют также элективные среды: желчь и среду Раппопорт.

На дифференциально-диагностических средах Эндо, ЭМС, Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний, так как не расщепляют лактозу, входящую в состав среды. На ВСА через 48 ч они образуют колонии черного цвета, оставляющие след после того, как их снимают петлей (кроме сальмонелл паратифа А). У свежевыделенных культур S. paratyphiВ после инкубации в термостате в течение 18-20 ч и выдерживания при комнатной температуре в течение 1-2 сут на периферии колонии образуется слизистый вал.

**Ферментативные свойства**. Расщепляют глюкозу, маннит, мальтозу с образованием кислоты и газа. Исключением являются возбудители брюшного тифа (S. typhi), которые расщепляют эти сахара только до кислоты. Не ферментируют лактозу и сахарозу. Расщепляют белковые среды с образованием сероводорода. Индол не образуют. Желатин не разжижают**.**

**Материал для исследования**  Кровь. Испражнения. Моча. Дуоденальное содержимое.

**Ход исследования**

Первый день. Собранный материал сеют на дифференциальные среды и среды обогащения (селенитовую). На среду Плоскирева и ВСА засевают в 2 раза больше материала, чем на Эндо, так как в первой есть факторы, задерживающие рост.

Второй день. Вынимают чашки из термостата (инкубация 18-24 ч) и просматривают выросшие колонии невооруженным глазом и при помощи лупы. Несколько (5-6) подозрительных колоний выделяют на среду Олькеницкого или Рассела. Посев производят следующим образом: снятую колонию осторожно, не задевая края пробирки, вносят в конденсационную жидкость, затем штрихами засевают всю скошенную поверхность среды и делают укол в глубину столбика для выявления газообразования. Укол следует производить в центр агарового столбика.

Пробирки с посевами ставят в термостат. Если исследуемый материал был посеян на среду обогащения, то через 18-24 ч производят высев со среды обогащения на чашки с дифференциальными средами.

Третий день. Вынимают пробирки с посевами из термостата и просматривают характер роста. В состав комбинированных сред входят лактоза, глюкоза, иногда мочевина и индикатор.

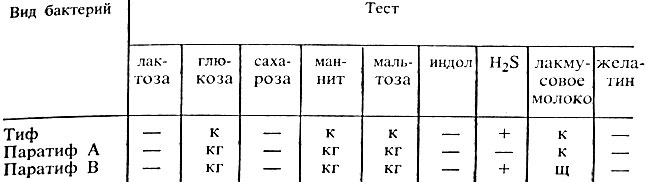
Расщепление глюкозы происходит только в условиях анаэробиоза. Поэтому скошенная поверхность среды при расщеплении глюкозы не изменяется, а столбик окрашивается в цвет, соответствующий индикатору. Бактерии, расщепляющие лактозу и мочевину, изменяют цвет всей среды.

Если выделенные культуры сбраживают лактозу или расщепляют мочевину, меняя цвет всей среды, то они не являются сальмонеллами и можно дать отрицательный ответ.

Культуру, расщепляющую только глюкозу, подвергают дальнейшему изучению: делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. При наличии в мазках грамотрицательных палочек изучают их подвижность и ферментативные свойства. Подвижность можно определить в висячей капле или в раздавленной капле, а также по характеру роста в полужидкой среде Гисса или в 0,2% агаре. При наличии подвижности при посеве уколом рост на среде диффузный, среда мутнеет.

Для выявления ферментативной активности производят посев на среды Гисса, МПБ, пептонную воду. В пробирки с последними средами опускают (под пробку) индикаторные бумажки для определения индола и сероводорода. Делают также посев на лакмусовое молоко.

Четвертый день. Учитывают биохимическую активность по результату ферментации углеводных и других сред.



**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШИГЕЛЛ**

Сем.-Enterobacteriaceae

Род- Shigella

Вид –Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh. boydii, Sh. sonnei

**Морфология.** Небольшие (2-3 × 0,4-0,6 мкм) палочки с закругленными концами. Нет спор, жгутиков и капсул. Грамотрицательны.

**Культивирование**. Факультативные анаэробы. Размножаются на МПА и МПБ при температуре 37° С и рН 7,2-7,4. Элективными и дифференциально-диагностическими средами для них являются среды Плоскирева, Эндо, ЭМС. Растут в виде небольших, полупрозрачных, сероватых, круглых колоний, размером 15-2 мм в S-форме. Исключением являются шигеллыЗонне, которые образуют крупные, плоские, мутные, с изрезанными краями колонии R-формы. В жидких питательных средах шигеллы дают равномерную муть, R-формы образуют осадок.

**Ферментативные свойства**. Они расщепляют углеводы без газообразования, не расщепляют лактозу и сахарозу. Исключением являются шигеллыЗонне, которые на 2-3-й сутки расщепляют эти углеводы. Протеолитические свойства: образование индола и сероводорода непостоянно, молоко свертывают, желатин не разжижают. По отношению к маннитушигеллы делятся на расщепляющие и не расщепляющие

**Материал для исследования** Испражнения. Секционный материал. Пищевые продукты.

**Ход исследования**

Первый день. При наличии в испражнениях гноя, слизи, крови, эти примеси захватывали петлей промывают изотоническим р-м натрия хлорида и наносят на чашку Петри с дифференциальной средой. Испражнения в глицериновой смеси эмульгируют, каплю эмульсии наносят на среду и шпателем втирают ее. Дифференциальными средами для шигелл являются среды Плоскирева, Эндо и ЭМС. Среда Плоскирева одновременно является и элективной средой. Параллельно с прямым посевом материал засевают на среду обогащения – селенитовый бульон. Посев производят в соотношении 1:4, 1:5. Все посевы помещают в термостат.

Второй день. Засеянные чашки вынимают из термостата, просматривают невооруженным глазом или через лупу. Подозрительные колонии (бесцветные) в количестве 4-6 отсевают на среду Рассела и маннит. Посев производят штрихами по скошенной поверхности и уколом в агаровый столбик. Засеянную среду Рассела помещают в термостат на 18-24 ч (параллельно делают пересев из селенитовой среды на дифференциальные среды).

Третий день. Вынимают посевы, сделанные на среду Рассела, из термостата. Культуры, не расщепившие лактозу, подвергают дальнейшему изучению: делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных палочек производят посев на среды Гисса, бульон с индикаторными бумажками (для выявления индола и сероводорода) и на лакмусовое молоко. Засеянные среды ставят в термостат на 18-24 ч.

Четвертый день. Вынимают посевы из термостата и учитывают результат. Культуры, подозрительные по своим ферментативным и культуральным свойствам в отношении шигелл, подвергают серологической идентификации. При отсутствии таких культур дают отрицательный ответ.

**День 8, 9. Дисбактериоз. Этапы Исследования.**

Дисбактериоз - это любые количественные или качественные изменения типичной для данного биотопа нормальной микрофлоры человека, возникающие в результате воздействия на макро– или микроорганизм различных неблагоприятных факторов.

Этапы исследования:

1 день: приготовление разведений фекалий и засев материала на плотные элективные и дифференциальные питательные среды (Плоскирева, ЖСА, Эндо, Эндо кровяной, желчно-кровяной, Сабуро, скошенный МПА по Шукевичу), на среды Вильсона — Блера (2 пробы: гретая и негретая), Блаурокка. Параллельно с прямым посевом испражнений делают посев на среды обогащения. Производится подготовка чашки с глюкозной средой для определения антагонистической активности исследуемой флоры.

2 день: просмотр чашек Петри, изучение выросших колоний, пересев подозрительных колоний со сред Эндо, Плоскирева на среду Клиглера; характеристика роста на скошенном МПА по Шукевичу (наличие или отсутствие ползучего роста), высев со среды накопления на плотные питательные среды (висмут-сульфитная среда); снятие подозрительных колоний с желчно-кровяного агара, с Эндо с кровью на кровяной агар; просмотр пробирок со средой Вильсона — Блера, пересев подозрительных колоний.

3 день: просмотр чашек со средами ЖСА (микроскопия, постановка тестов: плазма, маннит и др.), Сабуро (микроскопия; дальнейшая идентификация), кровяной агар (микроскопия, дальнейшая идентификация, биохимический ряд для идентификации энтерококков: молоко с синькой, маннит, ЭДДС, EF-агар), просмотр чашек на анаэробы, учет результатов роста на скошенной среде Клиглера (мазки, агглютинация), постановка пестрых рядов.

4 день: учет результатов биохимических тестов на стафилококки, энтерококки, энтеробактерии, анаэробы. Определение вида кандид. Постановка чувствительности к антибиотикам выделенных культур. Просмотр чашек с висмут-сульфитной средой, снятие подозрительных колоний на среду Клиглера. Посев на чашку с глюкозной средой музейных патогенных культур (S. typhimurium, Sh. sonnei, St. aureus и др.) для определения антагонистической активности исследуемой микрофлоры.5 день: просмотр пробирок со средой Блаурокка (микроскопия), учет чувствительности к антибиотикам выделенных культур; отбор подозрительных культур со среды Клиглера, агглютинация, постановка пестрых рядов, чувствительности к антибиотикам выделенных культур; просмотр среды Вильсона — Блера, при почернении среды с гретой культурой — постановка пестрого ряда (молоко с синькой, глюкоза, лактоза, маннит, сахароза, дульцит, мальтоза; МПА кровяной, ЖСА). Учет антагонистической активности

6 день: идентификация выделенных культур, высеянных со среды накопления, учет чувствительности к антибиотикам выделенных культур. Идентификация клостридий по классическим методикам. Выдача окончательного ответа. Все штаммы, подозрительные по культуральным и биохимическим признакам в отношении принадлежности к патогенным энтеробактериям, должны быть идентифицированы серологически.

**День 10. Иммунодиагностика.**

Реакция агглютинации

Реакция агглютинации (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.

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.

Постановка реакции. Существует два метода проведения этой реакции:

реакция агглютинации на стекле (ориентировочная): На обезжиренное предметное стекло наносят 2 капли специфической 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 (в пробирках): 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 разведение 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. 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 начинают с контролей. Контроль сыворотки должен оставаться прозрачным, контроль антигена - равномерно мутным. Просматривают пробирки в проходящем свете невооруженным глазом.

При положительном результате реакции в пробирках видны зерна или хлопья агглютината. Агглютинат постепенно оседает на дно в виде "зонтика", а жидкость над осадком просветляется. Различают мелкозернистую и хлопьевидную агглютинацию. Мелкозернистая (О-агглютинация) получается при работе с О-сыворотками\*. Хлопьевидная (Н) - при взаимодействии подвижных м/о со жгутиковыми Н-сыворотками.Интенсивность реакции выражают следующим образом:

++++ все клетки осели, жидкость в пробирке совершенно прозрачна. Результат реакции резко положительный.

+++ осадок меньше, нет полного просветления жидкости. Результат реакции положительный.

++ осадок еще меньше, жидкость мутная. Результат реакции слабо положительный.

+ незначительный осадок, жидкость мутная. Сомнительный результат реакции.

- осадка нет, жидкость равномерно мутная, как в контроле антигена. Отрицательный результат реакции.

Реакция преципитации

В реакции преципитации происходит выпадение в осадок специфического иммунного комплекса, состоящего из растворимого антигена (лизата, экстракта, (аптена) 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.)

Реакция кольцепреципитации. 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.

Реакцию сопровождают рядом контролей. Очень важна последовательность внесения в пробирку ингредиентов реакции. Нельзя наслаивать сыворотку на антиген (в контроле - на изотонический раствор), так как относительная плотность сыворотки больше, она опустится на дно пробирки, и граница между жидкостями не выявится.

Эта издавна используемая реакция преципитации, предложенная для определения токсичности коринебактерий дифтерии, ставится на фосфатно-пептонномагаре в чашке Петри. Вдоль ее посередине помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной антитоксической сывороткой. После подсушивания на расстоянии 1 см от края полоски бляшками диаметром 10 мм подсевают выделенные культуры. В одной чашке можно сеять от 3 до 10 культур, одна из которых, контрольная, должна быть заведомо токсигенной. Посевы помещают в термостат. Учет реакций проводят через 24-48-72 ч. Если культура токсигенная, на некотором расстоянии от полоски бумаги возникают линии преципитата, совпадающие с линиями преципитата контрольной культуры. Они имеют вид «стрел-усиков», которые хорошо видны в проходящем свете.

**День 11. Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.**

Сбор, использование, обезвреживание, размещение, хранение, транспортировка, учет и утилизация медицинских отходов должны осуществляться с соблюдением требований Санитарных правил в зависимости от степени их эпидемиологической, токсикологической и радиационной опасности, а также негативного воздействия на человека и среду обитания человека.

1. Отходы, не имеющие контакт с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными (эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО, далее - класс А), в том числе: использованные средства личной гигиены и предметы ухода однократного применения больных неинфекционными заболеваниями; канцелярские принадлежности, упаковка, мебель, инвентарь, потерявшие потребительские свойства; сметы от уборки территории; пищевые отходы центральных пищеблоков, столовых для работников мединских организаций, а также структурных подразделений организаций, осуществляющих медицинскую и (или) фармацевтическую деятельность, кроме подразделений инфекционного, в том числе фтизиатрического профиля. Сбор медицинских отходов класса А должен осуществляться в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного.
2. Отходы, инфицированные и потенциально инфицированные микроорганизмами 3-4 групп патогенности (эпидемиологически опасные отходы, далее - класс Б), в том числе: материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и (или) другими биологическими жидкостями; патологоанатомические отходы; органические операционные отходы (органы, ткани); пищевые отходы и материалы, контактировавшие с больными инфекционными болезнями, вызванными микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Медицинские отходы класса Б должны собираться работниками организации в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или в упаковку, имеющие желтую маркировку, в зависимости от морфологического состава отходов.
3. Отходы от деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний 3-4 группы патогенности, а также в области использования генно-инженерно-модифицированных организмов в медицинских целях (эпидемиологически опасные отходы, далее - класс В), в том числе: отходы микробиологических, клинико-диагностических лабораторий; отходы, инфицированные и потенциально инфицированные микроорганизмами 3-4 групп патогенности; отходы сырья и продукции от деятельности по производству лекарственных средств и медицинских изделий, от производства и хранения биомедицинских клеточных продуктов; биологические отходы вивариев; живые вакцины, непригодные к использованию.  Медицинские отходы класса В должны собираться в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) красного цвета или имеющую красную маркировку.
4. Отходы, не подлежащие последующему использованию (токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности, далее - класс Г), в том числе: ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование; лекарственные (в том числе цитостатики), диагностические, дезинфекционные средства; отходы от эксплуатации оборудования, транспорта, систем освещения, а также другие токсикологически опасные отходы, образующиеся в процессе осуществления медицинской, фармацевтической деятельности. Отходы класса Г, должны собираться в маркированные емкости с плотно прилегающими крышками любого цвета (кроме желтого и красного), которые хранятся в специально выделенных помещениях для хранения медицинских отходов.
5. Все виды отходов в любом агрегатном состоянии, в которых содержание радионуклидов превышает допустимые уровни, установленные нормами радиационной безопасности (радиоактивные отходы, далее - класс Д). Вывоз и обезвреживание медицинских отходов класса Д осуществляется организацией, имеющей разрешение (лицензию) на данный вид деятельности.

Дезинфекция – система знаний и совокупность мероприятий по полному или селективному уничтожению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, спор и выделяемых токсинов.

Дезинфекция посуды.

Посуду, бывшую в потреблении, в обязательном порядке подвергают дезинфекции. Для дезинфекции используют дезинфицирующие растворы, такие как: Централь, Абактерил и др. Дезинфицирующие растворы готовят в емкостях из стекла, пластмассы или покрытых эмалью в количествах, необходимых для полного погружения обрабатываемой посуды.

Посуду в перфорированной емкости опускают в бак с дезинфицирующим раствором и оставляют на определенное время.

После дезинфекции посуду промывают водопроводной водой до исчезновения запаха дезсредства и подвергают мойке растворами моющих средств. В лаборатории используют моющие средства, такие как: СМС – средство моющее синтетическое, Лотос, Астра, Прогресс (жидкость). Посуду замачивают в моющих средствах на на 25-30 минут при полном погружении. В этом же растворе посуду моют с помощью ерша.

Стерилизация – это обеспложивание, т. е. полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор. Существуют различные способы стерилизации, в основе которых лежит создание таких условий, при которых жизнедеятельность микроорганизмов была бы нарушена.

1. Стерилизация с помощью высокой температуры. - Эта стерилизация представляет собой прокаливание на пламени спиртовки. С помощью этого метода можно простерилизовать иглы и петли для посева, пинцет идр. Петлю или иглу поднести к пламени и держать до тех пор, пока она не покраснеет, после этого инструмент считается стерильным.
2. Кипячение - простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30 – 60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в специальных закрытых приборах – стерилизаторах. В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко в связи с тем, что продолжительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности.
3. Стерилизация паром под давлением - один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию как высокой температуры, так и повышенному давлению пара. Погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных приборах – автоклавах, закрывающихся герметично. Основные используемые режимы стерилизацииследующие: 15 – 30 мин. при избыточном давлении 0,5 атм (температура достигает 110 – 112 °С); 15-45 мин при избыточном давлении 1,0 атм (температура достигает 121 °С); 10 – 30 мин при избыточном давлении 1,5 атм (температура достигает 126 °С). Таким способом стерилизуют питательные среды, растворы, посуду, инструменты, фильтры и т.д.

**12 день. Дифференцированный зачет.**

**ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ**

Ф.И.О. обучающегося Макина Дарья Евгеньевна

Группы 221специальности Лабораторная диагностика

Проходившего (ей) производственную (преддипломную) практику

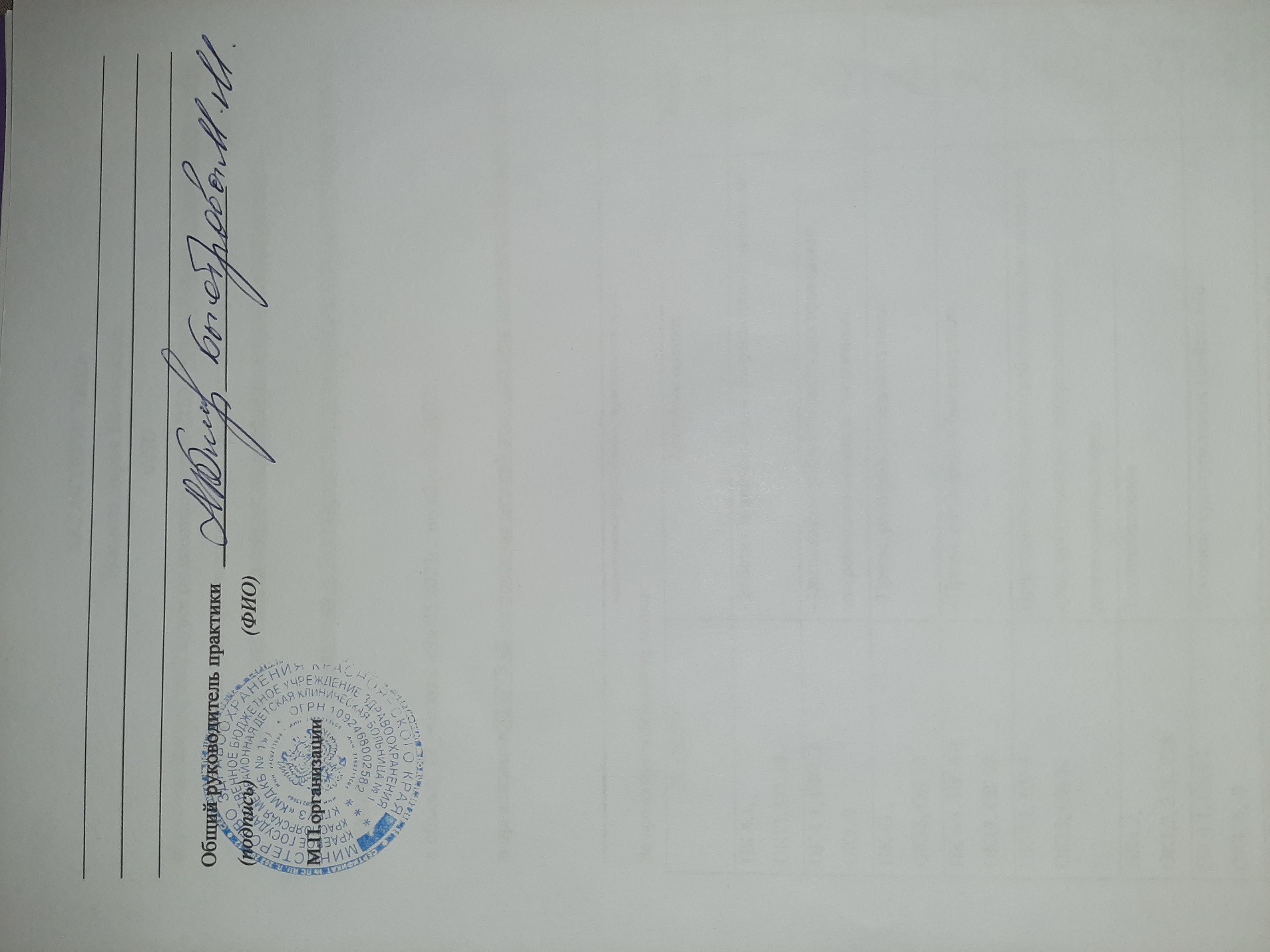
с 9.05 по 21.05 2022г

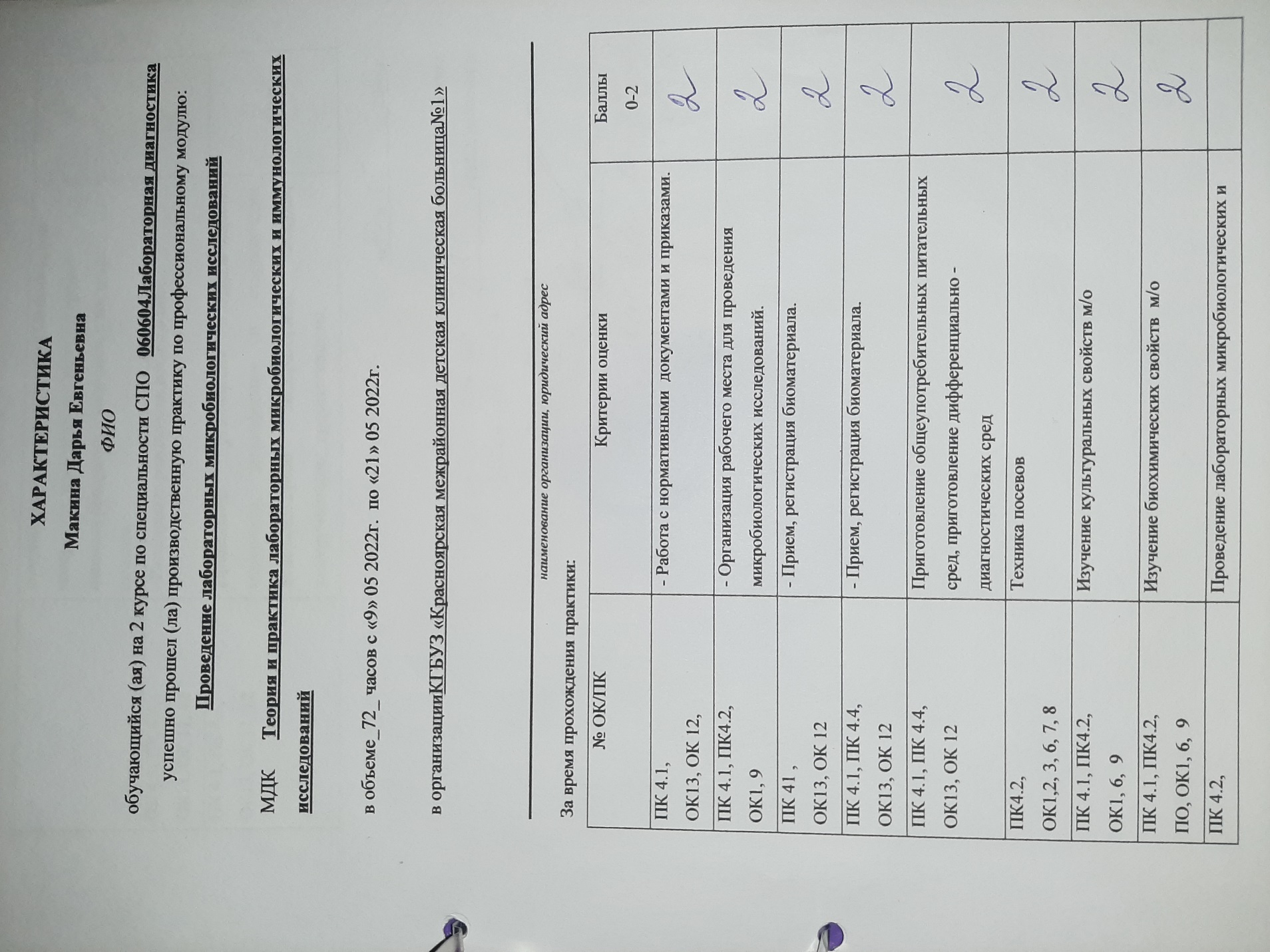
За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

1. Цифровой отчет

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | Виды работ 4 семестр | **Количество** |
| 1. | - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ: | 2 |
| 2. | - прием, маркировка, регистрация биоматериала. | 16 |
| 3. | Приготовление питательных сред для культивирования патогенных кокков, возбудителей кишечных инфекций, ВКИ. | 57 |
| 4. | Изучение культуральных, морфологических свойств | 11 |
| 5 | Изучение сахаралитической, протеолитической, гемолитической активности | 11 |
| 6 | Серодиагностика РА | 11 |
| 7 | РП | 11 |
| 8 | РСК | 11 |
| 9 | РИФ | 11 |
| 10 | РНГА | 11 |
| 11 | Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; | 259 |
| 12 | участие в проведении внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований | 1 |

|  |
| --- |
|  |



**

