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 разделу «Теория и практика лабораторных микробиологических исследований»

Содунам Сырга Буяновна

ФИО

Место прохождения практики

 КГБУЗ ККБ «Бактериологическая лаборатория»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (медицинская организация, отделение)

с «05» июня 2018 г. по «18» июня 2018 г.

Руководители практики:

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

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Копытко Л.Н\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Методический – Ф.И.О. (его должность) Нестеренко. Н.В\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Красноярск, 2018

**Содержание**

1. Цели и задачи практики

2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики

3. Тематический план

4. График прохождения практики

5. Инструктаж по технике безопасности

6. Содержание и объем проведенной работы

7. Манипуляционный лист (Лист микробиологических исследований)

8. Отчет (цифровой, текстовой)

**Цели и задачи практики:**

1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений и навыков по методам микробиологических и иммунологических исследований.
2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических умений по методам микробиологических и иммунологических исследований.
3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.
4. Осуществление учета и анализ основных 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 самостоятельно:*

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

**По окончании практики студент должен**

**представить в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ЛПУ.
2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ЛПУ.
3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).
4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате 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/Медицинский лабораторный техник**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | **Наименование разделов и тем практики** | **Всего часов** |
|
|
|  | **4/6 семестр** | **72** |
| 1 | Ознакомление с правилами работы в бак лаборатории | 6 |
| 2 |  Подготовка материала к микробиологическому исследованиям: прием , регистрация биоматериала | 6 |
| 2 | Приготовление питательных сред общеупотребительных, элективных, дифференциально-диагностических для выделения возбудителей гнойно-воспалительных и кишечных инфекций.  |  6 |
| 3 | Микробиологическая диагностика возбудителей инфекционных заболеваний (гнойно-воспалительных, кишечных) | 30 |
| 4 | Дисбактериоз. Этапы исследования . | 6 |
| 5 |  Иммунодиагностика : РА, РП, РСК,РИФ | 6 |
| 6 |  Утилизация отработанного материала, дезинфекция и стерилизация использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты. | 6 |
| 7 | Дифференцированный зачет | 6 |

 ***1 день***

 Микробиологическая лаборатория располагается в отдельно стоящем здании. На окнах установлены металлические решетки. В лаборатории должна быть установлена охранная сигнализация.Лаборатория имеет 2 входа: один – для сотрудников, другой – для доставки материала на исследование (допускается получение материала через передаточное окно). Помещения лаборатории разделены на «чистую» и «заразную» зоны, обеспечивая поточность продвижения патогенных биологических агентов (ПБА).

К помещениям «чистой» зоны относятся:

Лаборантская комната – для работы с документацией и литературой;

Средоварочная или комната для приготовления и разлива питательных сред. Здесь находятся весы, мерная посуда, рН метр, холодильники. После взвешивания, сухие питательные среды растворяют в дистиллированной воде, доводят до кипения, стерилизуют в автоклаве. Для роста разных видов микробов требуется определенная реакция среды в пределах от 6,8-8,0. Реакцию среды питательных сред определяют с помощью рН-метра. Для подщелачивания среды пользуются 2% раствором едкого натра, а подкисление производят 20% раствором хлористоводородной кислоты. Хранение питательных сред осуществляется в холодильниках, шкафах. Среды обязательно должны быть подписаны и указана дата приготовления.

Автоклавная (стерилизационная) – это комната для проведения стерилизации приготовленных питательных сред. Она оборудована автоклавами.

Моечная – это комната предназначена для мытья посуды. Она оборудована раковинами, ванной.

К помещениям «заразной» зоны относятся:

Автоклавная – это комната, в которой проводится обеззараживание исследуемого материала.

Бактериологическая комната - предназначена для проведения исследований бактериологическим методом.

Серологическая – комната для проведения серологических исследований.

Рабочие помещения лаборатории светлые, просторные, теплые, снабжены подводкой холодной и горячей воды, электричеством. Стены выложены кафельной плиткой , потолки и пол имеют гладкую поверхность, легко моющиеся, устойчивы к дезинфектантам. Поверхности рабочих столов также водонепроницаемы, устойчивы к дезинфицирующим веществам.

На рабочем столе бактериолога должны находиться следующие предметы:

высокая банка с дез.раствором для обеззараживания использованных пипеток;

емкость с дез.раствором для сбрасывания мазков;

фиксатор для мазков (96град спирт);

емкость с 70 град спиртом для обеззараживания рук и поверхности рабочего стола;

чашка Петри с предметными стеклами;

чашка Петри с покровными стеклами;

баночка с ватными тампонами;

емкость с бактериологической петлей, бактериологической иглой, пинцетом, шпателем;

газовая горелка или спиртовка

кусочек хозяйственного мыла для обезжиривания предметных стекол, карандаш по стеклу, простой карандаш;

крышка от чашки Петри для приготовления мазков.

Бактериологическая лаборатория оснащена следующим оборудованием:

Автоклав – прибор, который проводит стерилизацию предметов с помощью пара под давлением (один - для стерилизации питательных сред, другой – для обеззараживания исследуемого материала). Автоклав состоит из котла, покрытого наружным кожухом, и внутренней рубашки. С котлом соединена воронка с краном для воды и толстое водомерное стекло. Во внутреннюю рубашку входят трубки с кранами для выпуска пара. На одной из них имеется предохранитель с противовесом и манометр, другая, расположена у дна котла, служит для выпуска воздуха и влажного пара. Автоклав закрывают массивной крышкой, завинчивающейся 6-8 «барашками». Перед пуском автоклава в котел через воронку наливают воду, наблюдая по водомерному стеклу за ее количеством, которое должно занимать около ¾ объема котла. Затем неплотно загружают автоклав биксами, в которых находятся предметы, подлежащие стерилизации или обеззараживанию. Контроль стерилизации осуществляется с помощью индикаторных лент, которые также закладывают в автоклав, затем закрывают крышку автоклава и включают обогревательную систему. Краны для выхода пара в это время должны быть открыты. Когда вода закипает, пар выходит из верхнего крана. По мере наполнения котла паром, воздух до конца вытесняется и пар пойдет струей из из обоих кранов. После этого перекрывают краны, стрелка манометра начнет двигаться и регулируем обогрев так, чтобы заданное давление держалось в течение необходимого времени. По окончании стерилизации выключают обогревательную систему, дают остыть автоклаву, открывают кран, спускают пар. Стрелка манометра должна опуститься до 0, затем открывают крышку автоклава. Учитываем результаты контроля правильной работы автоклава. Для этого сравниваем изменение цвета индикаторной ленты с контрольным образцом. Результаты проведения стерилизации регистрируются в специальном журнале.

Сушильный шкаф – прибор, который проводит воздушную стерилизацию, предназначен для стерилизации стеклянной лабораторной посуды (чашки Петри, пробирки, пипетки). Перед стерилизацией посуду необходимо правильно подготовить: для этого чистые и сухие пипетки закрывают ваткой с того конца, который берут в руки, затем заворачивают в бумагу и помещают либо в пеналы, либо заворачивают в пачки по несколько штук. В пробирки вставляют ватные или ватно-марлевые пробки и заворачивают также в пачки по 5-10 штук и больше, чашки Петри также по несколько штук заворачивают в бумагу. Затем все помещают в сушильный шкаф. Контроль воздушной стерилизации осуществляется также химическим методом с помощью индикаторов. Результаты проведенной стерилизации записываются в специальных журналах

Дистиллятор – прибор для получения дистиллированной воды.

Термостат – оборудование для культивирования микроорганизмов, оптимальная температура роста бактерий 37С.

В лабораториях, выполняющих исследования на особо опасные инфекции, существует ряд особенностей для обеспечения максимальной биологической безопасности персонала, населения и окружающей среды. Так, вход в лабораторию и выход из нее осуществляются через санитарный пропускник. Санпропускники располагают на границе «чистой» и «заразной» зон. Они предназначены для исключения выноса на одежде и на теле людей специфических микроорганизмов при переходе персонала из более «грязных» помещений в менее «грязные». При входе обязательно полное переодевание в специальную одежду, при выходе перед переодеванием обязательна целевая санитарная обработка (душ, дезинфектанты) персонала.

Изоляция сотрудников лаборатории от инфекционного материала осуществляется с помощью защитных боксов, противочумных костюмов, пневмокостюмов с избыточным давлением внутри. С помощью боксов создают физические барьеры для предотвращения возможных контактов работающего персонала с инфекционным материалом. Различают защитные боксы с частичным удержанием микробов ( боксы 1-го и 2-го классов) и с полным их удержанием или изолирующие боксы (боксы 3 класса). Боксы 1 и 2 класса представляют собой защитные конструкции с проемом в передней панели для рук работающего. Для защиты персонала и рабочих помещений в боксах создается нисходящий вертикальный воздушный поток благодаря рециркуляции части засасываемого в бокс воздуха. Выводимый из бокса воздух очищается в высокоэффективных аэрозольных фильтрах. Работа в боксе 3 класса осуществляется с использованием резиновых перчаток плечевого типа, герметически за деланных в стенки бокса. Боксы 1 и 2 класса используют для работы с микробами низкой категорией риска.

Для предохранения медицинского персонала и всех лиц, работающих с микроорганизмами I - II групп патогенности применяют защитную одежду в виде противочумных костюмов первого, второго, третьего или четвертого типов (в зависимости от вида возбудителя и характера выполняемой работы).

Первый тип ПЧК: пижама, большая косынка противочумный халат, ватно-марлевая маска, очки (целлофановая пленка), резиновые перчатки, полотенце, носки, тапочки, сапоги.

Второй тип ПЧК: первый тип ПЧК, только без очков

Третий тип ПЧК: первый тип ПЧК, кроме очков, маски и вместо резиновых сапог- резиновые калоши.

Четвертый тип ПЧК: пижама, шапочка медицинская, халат, носки, тапочки.

К ПБА I группы патогенности из бактериальных инфекций относится возбудитель чумы, II группе – возбудители сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, холеры, сапа, миелоидоза, III группе – возбудители дизентерии, сальмонеллеза, брюшного тифа, менингита, дифтерии, коклюша и др.

***2 день***

Прием, регистрация, маркировка биоматериала.

.Для предохранения от инфицирования медицинского персонала и пациентов при сборе проб биоматериалов и доставке его в лабораторию необходимо:

- не загрязнять наружную поверхность посуды при сборе и доставке проб;

- не загрязнять сопроводительные документы (направления);

- свести к минимуму непосредственный контакт пробы биоматериала с руками медицинского работника, собирающего и доставляющего его в лабораторию;

- использовать стерильные одноразовые или разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке контейнеры (емкости) для сбора, хранения и доставки проб;

- транспортировать пробы в переносках или укладках с раздельными гнездами;

- соблюдать асептические условия для предотвращения инфицирования пациента в процессе выполнения инвазивных мероприятий;

- собирать пробы в стерильную одноразовую или стеклянную посуду (не загрязненную биоматериалом, не испорченную трещинами, отколотыми краями и другими дефектами).

 Пробы биоматериала необходимо собирать следующим образом:

- до начала антибактериальной терапии, при отсутствии такой возможности - непосредственно перед повторным введением (приемом) препаратов;

- в количестве (вес, объем), необходимом для выполнения анализа, т.к. недостаточное для исследования количество биоматериала приводит к получению ложных результатов;

- с минимальным загрязнением материала нормальной микрофлорой, т.к. ее наличие приводит к ошибочной трактовке результатов, полученных, например, при исследовании мокроты, проб из носа, глотки (зева), гениталий и др.

 При сборе пробы следят за тем, чтобы в лаборатории при вскрытии емкости с биоматериалом не образовывался аэрозоль: пробы крови и других жидкостей организма аккуратно без образования пены переносят из шприца в сухую и/или наполненную средой (антикоагулянтом) посуду.

 В направлении на исследование указывают: фамилию, имя, отчество больного; год рождения; отделение, в котором он находится; номер истории болезни (амбулаторной карты); диагноз; материал, посылаемый на исследование, и задачи исследования; дату и время взятия материала (часы); антибактериальные (иммунные) препараты, если проба сдается на фоне антибиотико- и/или иммунотерапии; фамилию, имя, отчество лечащего врача (консультанта), направляющего пробу на исследование. При направлении биоматериалов, полученных при вскрытии, указывают также отделение, в котором умер больной.

 Перед сбором пробы, особенно при применении инвазивных методов, учитывается вероятность риска для пациента и пользы, а также значимость именно данного вида биоматериала для целей объективизации клинического диагноза и оценки проводимых или планируемых лечебных мероприятий.

***3 день***

Питательные среды:

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

Требования, предъявляемые к средам:

Среды должны соответствовать следующим условиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органогенов и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

Внимание! Микроорганизмы, как все живые существа, нуждаются в большом количестве воды.

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов — рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2—7,4).

Исключение составляют холерный вибрион — его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5—9,0) и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2—6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида;

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, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH2. Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других — низкий. Например, анаэробы размножаются при RH2 не выше 5, а аэробы — при RH2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8—1,2 гл амин-ного азота NH2, т. е. суммарного азота аминогрупп аминокислот и низших полипептидов; 2,5—3,0 гл общего азота N; 0,5% хлоридов в пересчете на натрия хлорид; 1% пептона.

Желательно, чтобы среды были прозрачными — удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Классификация сред:

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки.

1. Исходные компоненты. По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. В настоящее время разработаны среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непищевыми: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, сгустками крови и др. Несмотря на то, что состав питательных сред из натуральных продуктов очень сложен и меняется в зависимости от исходного сырья, эти среды нашли широкое применение.

Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

2. Консистенция (степень плотности). Среды бывают жидкие, плотные и полужидкие. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких веществ, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар — полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80— 100°С, застывает при 40—45°С.

Желатин — белок животного происхождения. При 25— 30°С желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при рН ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с селикагелем.

3. Состав. Среды делят на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. Назначение: а) основные (общеупотребительные) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов. Это вышеупомянутые МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода; б) специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах. Например, для культивирования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмо- и менингококков — сыворотку крови, для возбудителя коклюша — кровь; в) элективные (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Так, соли желчных кислот, подавляя рост кишечной палочки, делают среду элективной для возбудителя брюшного тифа. Среды становятся элективными при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН.

Жидкие элективные среды называют средами накопления. Примером такой среды служит пептонная вода с рН 8,0. При таком рН на ней активно размножается холерный вибрион, а другие микроорганизмы не растут; г) дифференциально-диагностические среды позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности, например среды Гисса с углеводами и индикатором. При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды; д) 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.

***4 день***

Для идентификации культур выделенных микробов Их подвергают детальному изучению. Характеристика данного микроорганизма складывается из морфологических, культуральных, биохимических и серологических признаков, которые позволяют его идентифицировать, т. е. определить его природу.

**Морфологические свойства** определяются путем бактериоскопии окрашенных мазков и изучения микробов в живом виде (висячая капля). При микроскопировании обращают внимание на форму микроба, его расположение, величину, наличие спор, капсул, отношение к методам окраски.

**Культуральные свойства**. Так как бактериоскопически не всегда удается определить вид микроба, то следующим этапом является бактериологическое исследование, т. е. изучение роста микробов на питательных средах.

**Биохимические свойства**. Для более точного определения вида применяют изучение биохимических свойств микробов (см. стр. 88). При этом определяют отношение микроба к кислороду, его ферментативные и редуцирующие свойства, образование в культурах определенных продуктов обмена и изменение реакции среды.

**Характеристика роста бактерий на плотных и жидких средах**. При изучении колоний макроскопически (невооруженным глазом) различают ее величину, форму, цвет, прозрачность, характер поверхности.

По величине различают колонии мелкие, т. е. 1—3 мм, средние — 2—4 мм, крупные — 4—6 мм и более в диаметре.

**По форме** колонии бывают круглые, имеющие резко очерченные контуры. Колонии с нервными неправильными краями, ризоидные, т. е. напоминающие переплетенные корни дерева, и гирозные, состоящие из переплетенных валиков, похожие на извилины мозга. Колонии могут быть плоскими, приподнятыми и куполообразными.

**Цвет колоний** может быть разнообразным: сероватобелым, желтым, оранжевым, красным и т. д.

По прозрачности колонии различают просвечивающие, т. е. такие, через которые виден контур предметов, и непрозрачные (мутные), которые света не пропускают.

Поверхность колонии может быть гладкая, морщинистая, блестящая, тусклая, влажная, сухая, слизистая.

Более детально структура колонии изучается через лупу, окуляр или под микроскопом с малым увеличением (№ 3 или 8). Тогда чашку ставят на столик микроскопа дном вверх, чтобы на колонию можно было установить объектив.

При таком увеличении можно рассмотреть характер краев колонии (ровные, зазубренные, фестончатые), характер поверхности (гладкая, шероховатая), структура колонии [однородная (гомогенная), т. е. имеющая однообразное строение во всех частях колонии; мелко-, среднеили грубозернистая, нитевидная].

Каждому виду микробов свойственен определенный характер колоний. Так, кишечная палочка образует колонии средней величины, полупрозрачные с голубоватым оттенком, а стафилококки — мелкие, плотные, желтоватого или белого цвета. Нередко характер колонии имеет диагностическое значение для определения вида микробов.

Рост микробов на скошенном агаре. На скошенном агаре рост изучают невооруженным глазом и отмечают те же характерные особенности, что и при исследовании колоний. Следует различать рост пышный, скудный и умеренный; непрозрачный, прозрачный и полупрозрачный; влажный, матовый и сухой; бесцветный, сероватобелый или с наличием пигмента.

Рост при посеве уколом в столбик среды. При росте по ходу укола в столбике агара обычно наблюдается форма роста по Линии укола. Она может быть нитевидная с боковыми разветвлениями или без них и четкообразная. При росте на желатине отмечают еще наличие или отсутствие разжижения. Если наблюдаются разжижение, то характер его может быть различным: кратерообразное разжижение, воронкообразное и послойное, т. е. идущее сверху, горизонтально, по направлению вниз. Методом посева уколом в столбик питательной среды можно определить подвижность бактерий. Для этого исследуемую культуру засевают в столбик полужидкой питательной среды. Посев ставят в термостат на 24 часа. Если бактерии не имеют жгутиков, то рост будет только вдоль линии укола или в виде пальцеобразных выростов. У подвижных бактерий рост — диффузный, по всей толщине питательной среды.

***5 день***

**Протеолитические свойства** - способность расщеплять белки, полипептиды и т. п. Изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При росте на желатиновой среде микробов, ферментирующих желатин, среда разжижается. Характер разжижения, вызываемый разными микробами, различен. Микробы, расщепляющие казеин (молочный белок), вызывают пептонизацию молока - оно приобретает вид молочной сыворотки. При расщеплении пептонов могут выделяться индол, сероводород, аммиак. Их образование устанавливают с помощью индикаторных бумажек. Фильтровальную бумагу заранее пропитывают определенными растворами, высушивают, нарезают узенькими полосками длиной 5-6 см и после посева культуры на МПБ помещают под пробку между нею и стенкой пробирки. После инкубации в термостате учитывают результат. Аммиак вызывает посинение лакмусовой бумажки; при выделении сероводорода на бумажке, пропитанной 20% раствором свинца ацетата и натрия гидрокарбоната, происходит образование свинца сульфата - бумажка чернеет; индол вызывает покраснение бумажки, пропитанной раствором щавелевой кислоты. Помимо указанных сред, способность микроорганизмов расщеплять различные питательные субстраты определяют с помощью бумажных дисков, пропитанных определенными реактивами (системы индикаторные бумажные "СИБ"). Эти диски опускают в пробирки с исследуемой культурой и уже через 3 ч инкубации в термостате при 37° С по изменению цвета дисков судят о разложении углеводов, аминокислот, белков и т. д.

Расщепление углеводов (**сахаралитическая активность**), т. е. способность расщеплять сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты или кислоты и газа, изучают на средах Гисса, которые содержат тот или иной углевод и индикатор. Под действием образующейся при расщеплении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Поэтому эти среды названы "пестрый ряд". Микробы, не ферментирующие данный углевод, растут на среде, не изменяя ее. Наличие газа устанавливают по образованию пузырьков в средах с агаром или по скоплению его в "поплавке" на жидких средах. "Поплавок" - узкая стеклянная трубочка с запаянным концом, обращенным вверх, которую до стерилизации помещают в пробирку со средой. Кроме того, сахаролитическую активность изучают на средах Эндо, ЭМС, Плоскирева. Микроорганизмы, сбраживая до кислоты находящийся в этих средах молочный сахар (лактозу), образуют окрашенные колонии - кислота изменяет цвет имеющегося в среде индикатора. Колонии микробов, не ферментирующих лактозу, бесцветны.

Молоко при росте микробов, сбраживающих лактозу, свертывается.

При росте микроорганизмов, образующих амилазу, на средах с растворимым крахмалом происходит его расщепление. Об этом узнают, прибавив к культуре несколько капель раствора Люголя - цвет среды не изменяется. Нерасщепленный крахмал дает с этим раствором синее окрашивание.

**Гемолитические свойства** (способность разрушать эритроциты) изучают на средах с кровью. Жидкие среды при этом становятся прозрачными, а на плотных средах вокруг колонии появляется прозрачная зона. При образовании метгемоглобина среда зеленеет.

***6 день***

СЕРОДИАГНОСТИКА – распознавание этиологической сущности заболеваний (бактериальных, грибковых, вирусных и паразитарных преимущественно) посредством выявления антител в сыворотке крови (отсюда и происходит термин «серодиагностика»). На практике чаще всего используются реакция связывания комплемента (РСК), реакция агглютинации (РА), реакция гемагглютинации (РГА), реакции преципитации (РП) и бактериолиза.

Реакция связывания комплемента – одна из наиболее чувствительных иммунологических диагностических реакций. Принцип ее заключается в том, что при взаимодействии специфических антигена и антитела происходит связывание комплемента. Индикатором служит гемолитическая система (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка к ним). Отсутствие гемолиза (для него также необходим свободный комплемент) свидетельствует о том, что комплемент уже связан и, следовательно, в данной сыворотке (смешанной с данным антигеном) имеются антитела, способные взаимодействовать с избранным антигеном. В таких случаях говорят, что РСК положительна. Появление гемолиза свидетельствует о том, что комплемент свободен и таким образом против исследуемого антигена в крови больного нет антител; РСК отрицательна.

Реакция агглютинации заключается в способности многих антител склеивать специфические корпускулярные антигены (возбудители).

Реакция кольцепреципитации состоит в том, что при смешивании растворенного антигена с сывороткой крови, содержащей специфические к нему антитела, на грани соприкосновения антигена и сыворотки образуется кольцевидное помутнение (преципитат, выпадающий в осадок). Преципитация может быть обнаружена также в агаровом геле, если соседние лунки в нем заполнить специфическими антигеном и антителом (сывороткой больного, содержащей антитела).

Количественная оценка иммунологических реакций осуществляется путем разведения сыворотки (1 : 5, 1 : 10 и т. д. или 1:4, 1:8 и т. д.). Чем больше в крови антител, тем в большем разведении будет положительна та или другая иммунологическая реакция.

Серологические реакции становятся положительными только по истечении 10—12 дней от начала заболевания. Следовательно, это сравнительно поздняя диагностика (особенно при острых инфекционных заболеваниях). К более ранним методам распознавания этиологии заболеваний относятся бактериологические исследования (вирусологические, паразитологические) крови, мочи, мокроты, кала, гнойных выделений, а также аллергологические пробы.

После перенесенного заболевания количество антител в крови постепенно снижается; в небольших разведениях сыворотки они определяются месяцами, иногда годами. Поэтому серологические реакции используются для ретроспективной диагностики перенесенных заболеваний. При этом следует иметь в виду, что в небольших разведениях сыворотки антитела могут быть обнаружены при хроническом течении заболеваний (титр повышается только в периоды обострений), латентном инфицировании, после вакцинации, вакцинотерапии. Высокие и нарастающие (при повторных исследованиях) титры имеют неоспоримое диагностическое значение. Небольшие титры требуют тщательных сопоставлений с клиникой.

В клинике внутренних болезней серологические исследования необходимы при многих синдромах. Среди них в первую очередь следует назвать пневмонии различной этиологии (орнитоз, Ку-лихорадка, микозы, микоплазмы, пневмококки, стрептококки, стафилококки и др.), эндокардиты и миокардиты (стрептококковый, гонококковый, токсоплазмозный, бруцеллезный и т. д.), перикардиты и плевриты (туберкулезный, ревматический, грибковые, гнойные с разнообразной этиологией), полиартриты (ревматический, ревматоидный, гонококковый, бруцеллезный, дизентерийный и др.), гепато-лиенальный синдром, лимфаденопатии, лихорадки неясной этиологии и многие другие.

***7 день***

**ИММУНОМИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Иммунологические методы применяют для решения многих задач:

1. Оценка состояния иммунной системы человека (иммунного статуса) по определению количественных и функциональных характеристик клеток иммунной системы и их продуктов.

2. Определение состава и характеристик тканей человека: групп крови, резус фактора, трансплантационных антигенов.

3. Диагностика инфекционных болезней и резистентности к ним по обнаружению и установлению титров антител (серодиагностика), выявлению антигенов возбудителей в организме, определению клеточных реакций на эти антигены.

4. Сероидентификация культур бактерий и вирусов, выделенных из организма человека и животных.

5. Выявление в организме человека и во внешней среде любых веществ, обладающих антигенными или гаптенными свойствами (гормоны, ферменты, яды, лекарства, наркотики и т.п.).

6. Выявление иммунопатологических состояний, аллергий, трансплантационных и противоопухолевых реакций.

Все иммуномикробиологические методы можно разделить на 3 группы:

1) основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (феномены агглютинации, преципитации, гемагглютинации, иммобилизации и др.);

2) основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом (реакции непрямой гемагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации, угольной аггломерации, бентонит-агглютинации, связывания комплемента и др.);

3) с использованием меченых антител или антигенов (метод флюоресцирующих антител, иммуноферментный и радиоиммунный анализы и другие методы).

**РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ**

В этих реакциях принимают участие антигены в виде частиц (микробные клетки, эритроциты и другие корпускулярные антигены), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок.

Для постановки реакции агглютинации (РА) необходимы три компонента: 1) антиген (агглютиноген); 2) антитело (агглютинин) и 3) электролит (изотонический раствор натрия хлорида).

Ориентировочная реакция агглютинации (РА)

Ориентировочная, или пластинчатая, РА ставится на предметном стекле при комнатной температуре. Для этого пастеровской пипеткой на стекло наносят раздельно каплю сыворотки в разведении 1:10 - 1:20 и контрольную каплю изотонического раствора натрия хлорида. В ту и другую бактериологической петлей вносят колонии или суточную культуру бактерий (каплю диагностикума) и тщательно перемешивают их. Реакции учитывают через несколько минут визуально, иногда с помощью лупы (х5). При положительной РА в капле с сывороткой отмечают появление крупных и мелких хлопьев, при отрицательной - сыворотка остается равномерно мутной.



Рис. 2. Ориентировочная реакция агглютинации.

**РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ**

Реакции преципитации (РП) основаны на фенoмене образования видимого осадка (преципитата) или общего помутнения среды после взаимодействия растворимых либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии Аг с АТ. РП ставят в специальных узких пробирках. В качестве реагентов используют гипериммунные преципитирующие сыворотки с высокими титрами АТ к гомологичным Аг. РП позволяет быстро (в течение нескольких секунд) выявлять незначительные количества Аг (можно выявить антиген в таких малых количествах, которые не обнаруживаются химическим путем). Они очень чувствительны, и их применяют для тонкого иммунохимического анализа, выявляющего отдельные компоненты в смеси антигена.



Рис. 3. Схемы реакций преципитации в пробирке (А) и агаре (Б).

***8 день***

**РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)**

РСК широко используют для лабораторной диагностики венерических болезней, риккетсиозов, вирусных инфекций. Реакция протекает в две фазы. Первая фаза - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента. Вторая - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). Разрушение эритроцитов гемолитической сывороткой происходит только в случае присоединения комплемента к гемолитической системе. Если же комплемент адсорбировался ранее на комплексе антиген-антитело, то гемолиз эритроцитов не наступает.

При наличии в исследуемой сыворотке антител, комплементарных антигену, образующийся комплекс антиген-антитело связывает (адсорбирует) на себе комплемент. При добавлении гемолитической системы гемолиза не происходит (задержка гемолиза), т.к. весь комплемент израсходован на специфическую связь комплекса антиген-антитело, а эритроциты остались неизменными.

При отсутствии в сыворотке антител, комплементарных антигену, специфический комплекс антиген-антитело не образуется и комплемент остается не связанным. Поэтому при добавлении гемолитической системы комплемент присоединяется к ней. Результатом реакции в данном случае будет гемолиз эритроцитов - в пробирках образуется так называемая «лаковая» кровь.

***9 день***

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)**

Данный метод является экспрессным и высокочувствительным. Существуют две его разновидности.

При прямом методе к исследуемой взвеси микробов, фиксированной на стекле, добавляют сыворотку, меченную флуорохромом. Образующийся комплекс антиген-антитело при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами дает ярко-зеленое свечение.

При непрямом РИФ используют обычные диагностические сыворотки против какого-либо вида микробов. Добавление этой сыворотки к испытуемой взвеси микробов вызывает образование комплекса антиген-антитело. Этот комплекс выявляется с помощью универсальной флюоресцирующей сыворотки, содержащей антитела к гаммаглобулиновой фракции крови того вида животного, от которого была получена диагностическая сыворотка.

Светящийся комплекс выявляют при люминесцентной микроскопии.

**Иммуноферментный анализ (ИФА)**

В основе иммуноферментного анализа лежит известная иммунная реакция антигена и антитела. Один из этих реагентов является определяемым веществом, а другой - узнающим, обладающим известной стандартной специфичностью (избирательностью) по отношению к определяемому веществу.

Для выявления образовавшихся иммунных комплексов (антиген-антитело) используется фермент, которым предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). Сам фермент, естественно, не виден, поэтому визуализация присутствия вещества, определяемого методом ИФА, достигается применением посредника - хромогена. Это особое химическое соединение, которое хорошо растворимо в воде, и раствор которого бесцветен. Превращение бесцветного хромогена в цветное вещество хромофор происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом.

***10 день***

**Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)**

Реакция ставится: 1) для обнаружения полисахаридов, белков, экстрактов бактерий и других высокодисперстных веществ, риккетсий и вирусов, комплексы которых с агглютининами в обычных РА увидеть не удается, или 2) для выявления антител в сыворотках больных к этим высокодисперстным веществам и мельчайшим микроорганизмам.

Под непрямой, или пассивной, агглютинацией понимают реакцию, в которой антитела взаимодействуют с антигенами, предварительно адсорбированными на инертных частицах (латекс, целлюлоза, полистерол, оксид бария и др. или эритроциты барана, I(0)-группы крови человека)

В реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) в качестве носителя используют эритроциты. Нагруженные антигеном эритроциты склеиваются в присутствии специфических антител к данному антигену и выпадают в осадок. Сенсибилизированные антигеном эритроциты используют в РПГА как эритроцитарный диагностикум для обнаружения антител (серодиагностика). Если нагрузить эритроциты антителами (эритроцитарный антительный диагностикум), то можно применять для выявления антигенов.



Рис. 6. Схема РПГА: эритроциты (1), нагруженные антигеном (3), связываются специфическими антителами (4).

Постановка. В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроли). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч.

Учет. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка.

 Рис.7. Учет РНГА (РПГА).

***11 день***

Дезинфекция и стерилизация лабораторной посуды:

В микробиологической практике применяют различные дезинфицирующие вещества : 0,2% раствор жавель-солида, 3-5% растворы фенола, 5-10% растворы лизола, 1-5% растворы хлорамина, 3-6% растворы перекиси водорода, 1-5% растворы формалина, растворы сулемы в разведении 1:1000 (0,1%), 70% спирт и др.
 Дезинфекции подвергают отработанный патологический материал (гной, кал, моча, мокрота, кровь, спиномозговая жидкость) перед сливом его в канализацию. Обеззараживание проводят сухой хлорной известью или 3-5% раствором хлорамина.
Загрязненные патологическим материалом или культурами микроорганизмов пипетки, стеклянные шпатели, предметные и покровные стекла опускают на сутки в стеклянные банки с 0,2% раствор жавель-солида, 3% раствором фенола или перекиси водорода. Препаровальные иглы, бактериальные петли после употребления немедленно прокаливают на огне.**.**
По окончании работы с заразным материалом лаборант должен обработать дезинфицирующим раствором рабочее место и руки. Поверхность рабочего стола протирают кусочком ваты, смоченным 3% раствором фенола. Руки дезинфицируют 1% раствором хлорамина.
Выбор дезинфицирующего вещества, его концентрация и длительность воздействия (экспозиция) зависят от биологических свойств микроба и от той среды, в которой будет происходить контакт дезинфицирующего вещества с патогенными микроорганизмами. Например, сулема, фенол, спирты непригодны для обеззараживания белковых субстратов (гной, кровь, мокрота), так как под их влиянием происходит свертывание белков, а свернувшийся белок предохраняет микроорганизмы от воздействия дезинфицирующего вещества.
При дезинфекции материала, инфицированного споровыми формами микроорганизмов, применяют 5% раствор хлорамина, 1-2, 5% растворы активированного хлорамина, 5-10% растворы формалина и другие вещества.
Дезинфекцию, которую проводят на протяжении всего дня по ходу работы, называют текущей, а по окончании - заключительной.

**Стерилизацию питательных сред** осуществляют различными способами в зависимости от тех ингредиентов, которые входят в их состав.

* Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15-20 мин в автоклаве при температуре 115-120°С.
* Среды с углеводами и молоком, питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100°С дробно или в автоклаве при 112°С.
* Среды, в состав которых входят белковые вещества обеспложиваются тиндализацией или фильтрованием.
* Для стерилизации питательных сред, содержащих в своем составе нативные белки, пользуются фильтрацией через мембранные фильтры Зейтца.

Подготовленные к употреблению питательные среды проверяют на стерильность.

**Подготовка к стерилизации лабораторной посуды**

* Перед стерилизацией лабораторную посуду тщательно моют и сушат.
* Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробки на каждый сосуд (кроме пробирок) надевают бумажный колпачек.
* Чашки Петри стерилизуют в стерилизаторе воздушном ГП-160-ОХ-ПЗ .
* Пастеровские пипетки по 3-5-10-15 штук заворачивают в плотную оберточную бумагу. В верхнюю часть каждой пипетки вкладывают кусочек ваты. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец.

**Лабораторную посуду стерилизуют:**

**а)** сухим жаром при температуре 180 градусе 1 час.
**б)** в автоклаве при давлении 1 атм. В течение 20-30 минут

***12 день***

Внутренний контроль качества микробиологических исследований:

Важным элементом работы микробиологической лаборатории является получение точных и сопоставимых результатов анализов, для чего необходимо осуществлять контроль качества проводимых исследований.

|  |
| --- |
|  |

Внутренний контроль качества микробиологических исследований - это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий развития искомого микроорганизма, а также предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата.

Особенностью санитарно-микробиологических исследований воды является необходимость количественной оценки полученного результата.
Специфика объекта микробиологических исследований, живого микроорганизма, обладающего индивидуальными (родовыми, видовыми, штаммовыми) свойствами и особенностями жизнедеятельности в условиях водной среды, создает независящие от исследователя проблемы в оценке точности количественного результата и обусловливает погрешность микробиологических методов, достигающую сотен процентов.

К наиболее значимым объективным факторам, влияющим на результат анализа, относятся следующие:
- Неравномерность распределения микроорганизмов, обусловливающая разброс данных при анализе двух одинаковых объемов одной пробы воды.

- Способность адсорбироваться на взвешенных веществах с образованием трудноразделимых в процессе взбалтывания комплексов, которые при посевах могут регистрироваться как один микроорганизм.
- Влияние сопутствующих микробов-антагонистов, тормозящих развитие искомых микроорганизмов при их наличии в анализируемой пробе воды.

Возможное присутствие в исследуемой воде посторонних химических веществ либо образование их соединений с компонентами питательной среды, которые могут угнетать /стимулировать/ рост исследуемых микроорганизмов, а также влиять на изменение видовых биохимических идентификационных признаков.
- Нахождение микроорганизма в "стрессовом" состоянии под воздействием неблагоприятных условий водной среды, в результате которого затормаживается его способность к развитию.
Исходя из этого, основной задачей микробиологических исследований является создание оптимальных условий для развития выделяемого микроорганизма в целях получения надежных, сопоставимых количественных результатов.

Организация внутреннего контроля качества на всех этапах выполнения микробиологического анализа воды является основой получения качественного результата.

Основные направления организации внутреннего контроля качества:

1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа: (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.).
2. Выполнение регламентированных процедур ведения тестовых культур.
3. Контроль качества питательных сред.
4. Контроль качества фильтрующих материалов (или далее - фильтров).
5. Контроль качества дистиллированной воды.
6. Оценка достоверности качественного результата путем использования заведомо положительных и отрицательных контролей.
7. Оценка доверительных границ полученного количественного результата.
8. Систематический анализ результатов контрольных процедур в целях совершенствования руководства по качеству.

Обязательным разделом внутреннего контроля качества является проведение периодического, но не реже 1 раза в год, анализа результатов выполненных контрольных процедур, с учетом которого осуществляется корректировка руководства по качеству испытательной лаборатории