

Министерство образования Республики Мордовия
Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение
Республики Мордовия «Краснослободский аграрный техникум»

Методическая разработка

**по МДК 02.02 «Методики диагностики и лечения заболеваний
птиц и декоративных животных»**

**на тему «Постановка реакции для выявления антител к вирусу
гриппа птиц иммуноферментным методом при тестировании
сывороток в одном разведении»**

2024 г.

Рассмотрена и одобрена
на заседании методической
комиссии *заведующий кафедрой*
дисциплин

Председатель *СН* С.Н. Морозова)

Протокол № *9* от « *12* » *02* 2024 г.

Утверждаю:
Зам. директора по учебной работе


_____ Т.В.Шитова

« *12* » *02* 2024 г

Автор: преподаватель Волков Виктор Николаевич

Тема занятия: Постановка реакции для выявления антител к вирусу гриппа птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

Ц е л и з а н я т и я	<ul style="list-style-type: none"> - студент должен иметь практический опыт по проведению серологических реакций; - должен уметь работать с индивидуальным и восьмиканальным дозаторами, планшетами, стрипами, реактивами, соблюдать технику безопасности и личную гигиену; - должен знать технику постановки реакции для выявления антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении; - образовательные усвоение новых знаний на основе имеющихся; - воспитательные воспитание самостоятельности, ответственности, наблюдательности; - развивающие развитие познавательных способностей → внимания, восприятия, наблюдательности, мышления, воображения.
---	--

Тип занятия: учебная практика.

Вид занятия: конкурс.

Методическое обеспечение: планшет с сенсibilизированными стрипами, пустой штатив для стрипов, пакет для оставшихся стрипов, липкая лента, дозаторы 8 канальный на 50-300 мкл, 1 канальный на 20-200 мкл, 100-1000мкл, фильтровальная бумага, емкость с дезсредством, ванночки для растворов 3 шт, наконечники для дозаторов, маркер, термошейкер или термостат, растворы из набора: сыворотки контрольные (К+ и К-), исследуемые сыворотки, ФСБТ, хромотоген - субстратный раствор, стоп-раствор (серная кислота). Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

Алгоритм занятия:

<p>1. Организационная часть. (готовность студентов, аудитории к занятию).</p> <p>2. Актуализация опорных знаний и умений.(решение задач, программированный опрос, письменная работа у доски, групповая фронтальная работа и т.д.).</p> <p>3. Целевое пространство. (название sit, ключевые смыслы, определение индивидуальной цели, озвучивание целей познавательной, развивающей), четкая формулировка целей, проблемы.</p> <p>4. Поисковое пространство. (работа педагога и студента, самостоятельное добывание знаний, формирование компетентностей и способов действия).</p> <p>5. Рефлексивное пространство.(оценивание индивидуальных целей, профессиональных компетентностей).</p> <p>6. Домашнее задание.</p>	<p>Приветствие, проверка присутствующих, готовность студентов к занятию, проверить наличие средств обучения.</p> <p>Ветеринарный врач ветеринарной лаборатории должен в совершенстве владеть компетенцией по иммуноферментному методу анализа.</p> <p>Данный конкурс проводится с целью закрепления практических умений и компетенций по выявлению антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.</p> <p>Задача: Выявить лучших студентов по проведению ИФА.</p> <p>Проведение инструктажа по технике безопасности и личной гигиены.</p> <p>Проведение жеребьевки.</p> <p>Участнику необходимо подготовить рабочее место: проверка дозаторов. Достаточного количества лабораторной посуды и расходных материалов.</p> <p>Ход работы:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Работа со стрипами, внесение в них контрольных и исследуемых сывороток; - Заклеивание стрипов и инкубирование при T 37⁰ C, 500об/мин, 30 минут; - Освобождение от содержимого стрипов и промывка буферным раствором в объёме 100 мкл для каждой лунки, 3 раза, подсушить; - В лунки налить по 100мкл ТМБ, заклеить липкой лентой, поставить на 10-15 минут в тёмное место; - Остановка реакции, стоп-раствором -100 мкл; - Интерпритация результата; - Соблюдение правил личной гигиены; - Соблюдение техники безопасности. <p>Уборка рабочего места.</p> <p>Учебник, стр.350-367. Составить кроссворд на тему: «Инфекционные болезни птиц».</p>
---	--

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 Цель и задачи конкурса

Постановка реакции для выявления антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении является современным методом серологической диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных и птицы. Ветеринарный врач ветеринарной лаборатории должен в совершенстве владеть компетенцией по иммуноферментному методу анализа.

Данный конкурс проводится с целью закрепления практических умений и компетенций по выявлению антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

Цели конкурса:

- студент должен иметь практический опыт по проведению серологических реакций;
- должен уметь работать с индивидуальным дозатором, восьмиканальным дозатором, планшетами, стрипами, реактивами;
- должен знать технику постановки реакции для выявления антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении, правила личной гигиены и техники безопасности;
- образовательные - усвоение новых знаний на основе имеющихся;
- воспитательные - воспитание самостоятельности, ответственности, наблюдательности;
- развивающие - развитие познавательных способностей — внимания, восприятия, наблюдательности, мышления, воображения

1.2 Перечень профессиональных умений, необходимых для прохождения конкурса

Умение:

- Соблюдение правил личной гигиены;
- Соблюдение правил техники безопасности;
- Подготовка рабочего места;
- Проведение иммуноферментного анализа;
- Умение работать с дозаторами;
- Интерпретация результатов;

1.3 Место проведения конкурса: Лаборатория «Микробиология с эпизоотологией», кабинет №35.

1.4 Форма организации работы: индивидуальная.

1.5 Оборудование:

Подготовка рабочего места:

С подготовленной поверхности (из шкафа) отбирают планшет с сенсibilизированными стрипами, пустой штатив для стрипов, пакет для оставшихся стрипов, липкая лента, дозаторы 8 канальный на 50-300 мкл, 1 канальный на 20-200 мкл, 100-1000мкл, фильтровальная бумага, емкость с дезсредством, ванночки для растворов 3 шт, наконечники для дозаторов, маркер, термошейкер(желательно) или термостат, растворы из набора: сыворотки контрольные (К+ и К-), исследуемые сыворотки(п-количество), ФСБТ, хромтоген- субстратный раствор, стоп-раствор(серная кислота).

II. Ход работы

2.1 Организационная часть /5 минут/.

Преподаватель проводит инструктаж по технике безопасности и мерам личной профилактики при проведении серологических реакций. Сообщает цели конкурса, а также приобретаемые умения. Образуется рабочее место, стол с инструментами.

2.2 Практическая часть

МОДУЛЬ А: Выполнение лабораторных исследований.

Постановка реакции для выявления антител иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении.

ИФА- иммуноферментный анализ

1. **ФСБТ-** фосфатно-солевой буфер с Твином (для промывания планшета)
2. **К+** положительная сыворотка
3. **К-** отрицательная сыворотка
4. **БР** –буфер для разведения сывороток, бесцветная прозрачная жидкость.
5. **Конъюгат** моноклональных антител к вирусу с пероксидазой хрена, прозрачная жидкость от розового до красного цвета.
6. **СР-** Субстратный раствор с перекисью водорода для разведения хромогена, бесцветная прозрачная жидкость.
7. **ТМБ-**Хромоген, тетраметилбензидин, бесцветная прозрачная жидкость.
8. **Стоп-раствор** Серная кислота, бесцветная прозрачная жидкость.

2.3 Подготовка компонентов реакции

1. Сыворотки хранят в течении 3-х суток при Т-4 С, при Т-20С до 50-60 суток. Перед использованием в течении 5-10 мин нагревают на водяной бане при Т-35 С. В случае выпадения осадка в пробах сывороток крови их обязательно осветляют центрифугированием в течении 10 минут при 2000об/мин.

2. **ФСБТ** разводят в 20 раз свежеприготовленном **ДВ** (дезинф. средстве). Пример: чтобы получить 500 мл необходимо добавить 25 мл концентрата к 475 мл ДВ. Хранить раствор при Т-4 С в течении 3 сут. Можно замораживать и хранить при Т-20С.

3. **Рабочий хромоген-субстратный раствор.** Раствор хромогена (ТМБ) разводят субстратным раствором (СР) в соотношении 1:1 перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

4. Компоненты, оставшиеся после частичного использования должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя при Т 2-8 С. Не переливать в другую посуду. Не смешивать с другими сериями.

2.4 Порядок

Перед входом на площадку студент одевает: 1- маску в грязной зоне, 2- колпак или чепчик, 3- халат, 4- одну бахилу, затем, перешагивает через красную линию и одевают вторую бахилу. Участник молча делает свои задания. Участнику нужно соблюдать личную гигиену, порядок проведения задания, соблюдать технику безопасности, убрать рабочее место как было изначально. После окончания конкурса участник снимает: 1- бахилу, и при переходе через красную линию, снимает 2 –ую бахилу. Затем снимает маску, чепчик, халат и потом перчатки, путём сворачивая их одну в одну, и кладёт в грязной зоне, в урну.

2.5 Алгоритм выявления антител к вирусу гриппа птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении

1.	Соблюдение правил личной гигиены: надел ли конкурсант следующие предметы одежды: халат, маска, перчатки, чепчик	0,2
2.	Подготовка рабочего места к проведению процедуры. Инструментарий:	0,4

	планшет для ИФА с лунками, набор для выявления антител методом ИФА штатиф для пробирок эппендорфа, 12 пробирок эппендорфа, ванночка для реагентов - 4 шт, маркер, полимерная пленка для ИФА, спиртовые тампоны, пинцет, фильтровальная бумага, мерный стеклянный стакан на 100 мл, ковчет металлический, одноразовые наконечники для дозаторов в штативе, калькулятор, сыворотки крови, дистиллированная вода, стеклянные палочки	
3.	Извлечь планшет из упаковки, достать необходимое количество стрипов, остальное поместить в пакет и герметично его закрыть	0,2
4.	Промаркировать планшет и стрипы (для контрольных и исследуемых сывороток), пробирки эппендорфа в соответствии с номерами исследуемых сывороток	0,3
5.	Выполнить разведение исследуемых сывороток. В пробирки эппендорфа с помощью дозатора отбирается не менее 100 мкл исследуемых сывороток	0,5
6.	После внесения каждой исследуемой сыворотки в пробирку эппендорфа наконечник сбрасывается в эксикатор	0,3
7.	К исследуемым сывороткам в пробирках эппендорфа вносится в соотношении 1:1 буфер для разведения образцов 100мкл, выполняется пипетирование для смешивания (не менее трех раз, без образования пены)	0,3
8.	После каждого внесения буфера для разведения сбрасывается наконечник в эксикатор	0,3
9.	В две лунки стрипа вносится по 100 мкл отрицательного контроля и положительного	0,3
10.	Из полученного разведения исследуемых сывороток (в пробирках эппендорфа) отбирается по 100 мкл и переносится в пронумерованные лунки стрипа, наконечник каждый раз сбрасывается	0,3
11.	Отрезать необходимую полоску полимерной пленки (по размерам стрипов) и закрыть ей лунки стрипов	0,3
12.	Установить планшет в термошейкер, плавно вставляя планшет и не допуская попадания капель жидкости на липкую ленту, зафиксировать держателем, выставить температуру 37 С, время инкубирования (не менее 1 мин) и число оборотов (500)	0,3
13.	Промаркировать 4 ванночки для реагентов (для промывочного раствора, конъюгата, хромоген-субстратного раствора и Стоп-раствора)	0,2
14.	Правильно рассчитать количество концентрата ФСБТ и дистиллированной воды для приготовления раствора, которым промывают планшет в соответствии с инструкцией (1:20), с учетом количества стрипов, учитывая, что для промывания одного стрипа нужно около 30 мл готового раствора	0,3
15.	Отмерить необходимое количество ФСБТ (раствор для промывки), дистиллированной воды и смешать в мерном стакане, помешивая стеклянной палочкой, перелить в ванночку для реактивов	0,3
16.	Правильно рассчитать количество концентрата-конъюгата и буфера для разведения образцов для приготовления раствора конъюгата в соответствии с инструкцией (1:50)	0,3
17.	Смешать полученные реактивы в мерном стакане и перенести в ванночку для реагентов	0,1
18.	Застелить дно лотка фильтровальной бумагой	0,3
19.	После звукового сигнала по истечении времени достать планшет из термошейкера	0,1
20.	Отклеить липкую ленту, стряхнуть содержимое лунок стрипов в лоток резкими движениями	0,2
21.	Подсушить на фильтровальной бумаге лунки стрипов путем постукивания планшета о фильтровальную бумагу 3-4 раза	0,2

22.	Во время подготовки дозатора к работе, и в остальное время, когда не идет работа в лунках стрипов, планшет находится перевернутым лунками вниз на фильтровальной бумаге для недопущения пересыхания лунок	0,4
23.	Установить 8-канальный дозатор на 300 мкл и провести промывку лунок 4 раза	0,2
24.	После каждого промывания полностью удалить жидкость постукиванием перевернутого планшета на фильтровальной бумаге.	0,2
25.	На 8-капельном дозаторе установить дозировку в 100 мкл и внести по 100 мкл раствора конъюгата в лунки стрипа	0,2
26.	Закрыть лунки новой полоской липкой ленты	0,2
27.	Планшет поместить в термошейкер и установить температуру 37С, время инкубирования не менее 1 мин и кол-во оборотов в мин в соответствии с инструкцией	0,2
28.	После звукового сигнала по истечении времени достать планшет из термошейкера	0,1
29.	Отклеить липкую ленту, стряхнуть содержимое лунок стрипов в лоток резкими движениями	0,3
30.	Подсушить на фильтровальной бумаге лунки стрипов путем постукивания планшета о фильтровальную бумагу 3-4 раза	0,2
31.	Установить 8-канальный дозатор на 300 мкл и провести промывку лунок раствором для промывки планшета 4 раза	0,2
32.	Каждый раз полностью удалить жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге	0,2
33.	Налить в подписанную ванночку достаточное количество хромоген-субстратного раствора	0,3
34.	Установить 8-канальный дозатор на 100 мкл В каждую лунку внести по 100мкл хромоген- субстратного раствора	0,2
35.	Инкубировать не менее 5 мин в темном месте при комнатной температуре (накрыв планшет листом фильтровальной бумаги)	0,3
36.	Налить в подписанную ванночку достаточное количество Стоп - раствора	0,2
37.	Установить 8-канальный дозатор на дозировку 50 мкл и добавить в каждую лунку стоп-раствор	0,2
38.	Умение пользоваться дозаторами (выставлять объем, набирать раствор без пузырей)	0,3
39.	Культура работы (жидкости наливаются и вносятся аккуратно не разбрызгивая) рациональное использование расходных материалов	0,2
40.	Соблюдены все правила техники безопасности при выполнении задания	0,1
41.	Уборка рабочего места	0,1
	Итого:	10,00

По итогам конкурса определяется победитель и призёры конкурса. Вручаются Грамоты за 1 место, 2 место и 3 место.

Оценка индивидуальных образовательных достижений по результатам текущего и итогового контроля производится в соответствии с универсальной шкалой (таблица).

Процент результативности (правильных ответов)	Качественная оценка индивидуальных образовательных достижений	
	балл (отметка)	вербальный аналог
90 ÷ 100	5	отлично
80 ÷ 89	4	хорошо
70 ÷ 79	3	удовлетворительно
менее 70	2	не удовлетворительно

**ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ**

СВЕДЕНИЯ О СЕРТИФИКАТЕ ЭП

Сертификат 726242342903868691666490759959119263676517201266

Владелец Ятайкин Геннадий Викторович

Действителен с 15.09.2023 по 14.09.2024