

Предмет: «Эпизоотология и инфекционные болезни животных с основами микробиологии и вирусологии».

Учебная практика № 1

Тема: Морфология и физиология микробов. Серологическая диагностика инфекционных заболеваний животных.

Цель: овладеть техникой приготовления простых питательных сред, освоить технику посевов на простые питательные среды. Освоить принципы и технику постановки серологических реакций при диагностике инфекционных заболеваний.

Время выполнения: 6 часов.

Место проведения: аудитории 419, 426, райветлаборатория.

Дидактическое и методическое обеспечение: готовые питательные среды (МПА, МПБ, МПЖ) в пробирках, агар в колбах для расплавления агара, спиртовки, бактериологические петли, пастеровские пипетки, скальпели, пинцеты, ванночки и термостат, мерные цилиндры, пробирки, колбы, стаканы, воронки, фильтровальная бумага, вата, марля, автоклав, текуче-паровой аппарат, сушильный шкаф, водяная баня, фильтровальные приборы, пробирки, бактериологические чашки, бумага для заворачивания посуды, колбы, предметные стёкла, оборудование для мытья лабораторной посуды, хозяйственное мыло, спирт-эфир, ерши, стенная доска, для высушивания лабораторной посуды, сибиреязвенный антиген стандартный, спиртовки, фарфоровые ступки с пестиками, набор для постановки Роз-Бенгал пробы, набор диагностикумов, сывороток, антигенов.

Охрана труда на рабочем месте (отдельная инструкция)

Порядок и последовательность выполнения работы:

1. Внеурочная подготовка.

1.1. Самостоятельно подготовиться к учебной практике.

Изучите теоретический материал по учебникам Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2017 стр. 177-178.

Эпизоотология и инфекционные болезни: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2015 стр.17-18

1.2. Подготовьте рабочую тетрадь.

1.3. Изучите инструкцию по охране труда

2. Работа в аудитории.

2.1. Пройдите входной контроль.

2.2. Подготовьте рабочее место и оборудование для работы.

2.3. Изучите методические указания и выполните задания:

Задание 1. Изучите методику приготовления простых питательных сред.

Задание 2. Изучите методику посева микробов на простые питательные среды.

Задание 3. Ознакомьтесь с методами заражения лабораторных животных разными способами.

Задание 4. Ознакомьтесь с техникой взятия крови у лабораторных животных.

Задание 5. Изучите методику постановки реакции преципитации методом наплаивания и подслаивания.

Задание 6. Ознакомьтесь с методикой постановки реакции агглютинации с бруцеллёзным Роз-бенгал антигеном (РБП).

2.4. Оформите выполненную работу в тетрадь.

2.5. Пройдите выходной контроль.

2.6. Приведите в порядок рабочее место.

3. Вопросы входного контроля: Google-тест

4. Методические указания по выполнению работы:

Задание 1. Изучите методику приготовления простых питательных сред.

Простые питательные среды, мясопептонный бульон и мясопептонный агар готовят на мясной воде.

Мясная вода. Мясо освобождают от костей, жира, пленок и сухожилий пропускают через мясорубку, заливают 2 или 4-х кратным количеством воды (по весу) и кипятят в течение часа. Жидкость фильтруют через вату или полотно, затем через фильтровальную бумагу. Фильтрат измеряют до первоначального объема дистиллированной воды.

Второй способ – мясной фарш заливают 2-4-х кратным количеством дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют на сутки в прохладном месте. На следующий день фарш отжимают, настой кипятят 30 минут и фильтруют.

Приготовленную мясную воду разливают по бутылкам и стерилизуют 30 минут в автоклаве при давлении в 1 атмосферу.

Мясопептонный бульон (МПБ). К мясной воде добавляют 1% пептона, 0,5% химически чистой поваренной соли и кипятят до растворения пептона. Затем в горячем бульоне определяют РН и добавляют 10%-ный раствор углекислой соды или деценормального раствора едкого натра устанавливая РН 7,2 – 7,4. После этого бульон еще раз кипятят 15-20 минут и фильтруют через двойной бумажный фильтр. Готовый бульон разливают по пробиркам и колбам, стерилизуют 15-20 минут в автоклаве при давлении в 1 атмосферу.

Мясопептонный агар (МПА). В мясопептонный бульон добавляют 2-3% агар-агара и расплавляют его нагреванием в автоклаве или текучепаровом аппарате. В расплавленном агаре определяют РН и устанавливают РН 7,2-7,4 добавлением 10%-ного раствора углекислой соды и деценормального раствора едкого натра. Для осветления среды добавляют на 1 литр расплавленного и охлажденного до 50° агара, белок одного куриного яйца или 10 мл кровяной сыворотки, после чего нагревают 20 минут в автоклаве при температуре 105°С для свертывания белка, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр (в нагретом автоклаве), разливают по колбам, затем стерилизуют в автоклаве при давлении в 1 атмосферу в течение 30 минут.

Задание 2. Изучите методику посева микробов на простые питательные среды.

Для выделения культур микробов из патологического материала незначительная часть его с помощью бактериологической петли или пастеровские пипетки вносят на какую-либо питательную среду. Этот процесс называется посевом.

Чтобы произвести посев, бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку берут в правую руку между большим, указательным и средним пальцами.

Перед посевом бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку прожигают на пламени горелки (тонкий конец пипетки при этом сгибают под прямым углом). Участок органа из которого будет проводиться посев, прижигают непосредственно

перед посевом, нагретым металлическим шпателем или разрезают стерильным скальпелем (при посеве бактериологической петлей).

В левую руку берут две пробирки с питательными средами – **МПБ** и **МПА**. Пробирки удерживают в наклонном положении между большим, указательным и средним пальцами левой руки. Обламывают кончик пастеровской пипетки, быстро проводят пипетку через пламя горелки, прокалывают орган в прижатом месте и насаживают в капилляр пипетки небольшое количество материала. При посеве из печени или селезенки пульпу насаживают движением капилляра вперед и назад, не извлекая капилляра из органа и не прокалывая его насквозь. В целях безопасности при производстве посевов и пересевов нужно пользоваться резиновой трубкой, один конец которой надевают на пипетку, а на другой надевают резиновую грушу.

После этого открывают правой рукой сразу обе пробирки, ватные пробки удерживают между мизинцем и ладонью правой руки, обжигают края пробирок на пламени, вносят пипетку с материалом в пробирку с бульоном, затем быстро насасывают небольшое количество бульона в капилляр и переносят его в пробирку со скошенным **МПА**. Края пробирок прожигают над огнем, после чего пробирки закрывают ватными пробками, также проведенными через пламя. И использованную пипетку немедленно помещают в сосуд дезинфицирующей жидкостью, а бактериологическую петлю тщательно прожигают на пламени и помещают в штатив. На пробирках специальным карандашом отмечают наименование органа, откуда взят был патматериал, номер экспертизы и дату посева.

Задание 3. Ознакомьтесь с методами заражения лабораторных животных разными способами.

Лабораторных животных чаще всего заражают подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно.

Иногда прибегают к внутрикожному, внутримозговому способам заражения; заражают животных через пищеварительный тракт, а также путем аппликации материала на конъюнктиву или на скарифицированную поверхность кожи. На месте инъекции шерсть выстригают, кожу обрабатывают спиртом или 2%-ным раствором карболовой кислоты. Подкожно материал вводят кроликам в области спины или живота; морским свинкам в области живота; белым мышам – в области спины у корня хвоста. Чтобы предупредить обратное вытекание материала, место укола захватывают пинцетом и сжимают; можно заклеить его кусочком ваты, смоченным коллодием. Объем вводимого подкожно материала обычно для кролика 0,5 – 2 мл, для морской свинки 0,5-1 мл, для белой мыши 0,2-0,5 мл.

Задание 4. Ознакомьтесь с техникой взятия крови у лабораторных животных.

Кровь у лабораторных животных берут для исследования, а также для изготовления комплимента и сывороток, необходимых для серологических реакций. У морских свинок и кроликов кровь можно брать из ушной вены или из сердца.

Из ушных вен кровь берут путем надреза или прокола сосуда. Удобно брать кровь из краевой вены уха. Шерсть на месте операции выстригают или выщипывают. Для

лучшего наполнения сосудов уха протирают ваткой смоченной ксилолом. У основания уха сосуд зажимают и острым скальпелем делают поперечный надрез его.

Первую каплю, крови убирают стерильной ватой, затем к месту надреза подставляют пробирку и заполняют ее кровью, причем кровь должна идти непрерывной струей по стенке пробирки. У белых мышей кровь берут, отсекая кончик хвоста. Или путем укола пастеровской пипеткой в сосудистое сплетение, расположенное в области внутреннего угла глаза.

Большое количество крови можно взять у кролика или морской свинки при помощи пункции сердца. Помощник фиксирует свинку на столе в спинном положении, чуть наклонив ее на себя левым боком к оператору. Указательным пальцем левой руки оператор отыскивает точку, где сильнее всего ощущается сердечный толчок. Этой точкой обычно является середина грудной клетки, несколько влево 0,5-1 см. от средней линии. Для получения крови берут 5-10 гр. шприц с толстой иглой длиной 2 см. Жало иглы должно быть предварительно слегка сточено. Шерсть на месте укола выстригают, а место укола дезинфицируют. Грудную стенку прокалывают, держа шприц правой рукой в несколько наклонном положении, спереди назад. При проколе надо указательный палец держать на штоке поршня и стараться слегка отодвигать его, чтобы в цилиндре создавалось отрицательное давление. При правильном попадании поршень легко поднимается, а цилиндр заполняется кровью.

От взрослой морской свинки можно взять однократно 5-6 мл крови, после этого животному тот час вводят подкожно физраствор, подогретый до температуры тела, соответственно количеству взятой крови. Повторно кровь у этого же животного можно брать не ранее чем через 10-15 дней.

Задание 5. Изучите методику постановки реакции преципитации методом наслаивания и подслаивания.

Реакция преципитации основана на взаимодействии двух прозрачных жидкостей, одна из которых содержит антиген (преципитиноген), другая — антитело (преципитин). При наличии двух специфических компонент происходит их соединение и на границе жидкостей образуется преципитат в виде беловатого диска (кольца).

В ветеринарной практике реакцию преципитации ставят при исследовании материала на сибирскую язву (кожи, шерсть, паренхиматозные органы, последние особенно в стадии загнивания). Реакцию можно ставить **горячим** или **холодным** способами. **Разница между ними состоит в приготовлении антигена.** Все компоненты, входящие в реакцию, должны быть совершенно прозрачны. В связи с этим необходима фильтрация антигена и сыворотки.

Присланные на исследование пробы патологического материала перед постановкой реакции стерилизуют в автоклаве.

Приготовление компонентов. Для приготовления преципитиногена присланный кусочек кожи измельчают; 1 грамм измельченной кожи кипятят в 10 мл Физраствора (в пробирке) 30—40 мин в водяной бане (горячий способ) или растирают в ступке с песком, заливают 0,3%-ным карболизированным физ. раствором в соотношении 1:10 и

настаивают 16—18 ч при комнатной температуре (холодный способ). После этого экстракты фильтруют до полной прозрачности через асбестовую вату.

Преципитирующую сибирезвенную сыворотку готовят на биофабриках. Непосредственно перед постановкой реакции ее следует профильтровать.

Постановка реакции. Реакцию преципитации ставят методом наслаивания или подслаивания. Для постановки реакции используют чисто вымытые, прозрачные сухие преципитационные пробирки (улленгутеские) размером: длина 5—7 см, диаметр 0,5—0,6 см.

Мерной пипеткой, а при массовых исследованиях — пипеткой Флоринского, наливают в пробирки по 0,2—0,3 мл преципитирующей сибирезвенной сыворотки. После этого пастеровской пипеткой осторожно по стенке наслаивают на сыворотку испытуемый экстракт в таком же количестве, как и сыворотку. Затем пробирку ставят в штатив. При использовании метода подслаивания в пробирку наливают 0,2—0,3 мл используемого экстракта, после этого пастеровской пипеткой осторожно (опустив ее на дно пробирки) подслаивают преципитирующую сыворотку в таком же количестве. Реакцию оценивают путем просмотра пробирок на темном фоне при проходящем свете. Реакция считается положительной, если в течение первых 15 мин с момента постановки реакции на границе соприкосновения жидкостей образуется серовато-белый диск (кольцо).

- ☐ **Положительную реакцию** (ясно выраженное кольцо) отмечают знаком +;
- ☐ **сомнительную реакцию** (нерезкое кольцо) знаком ±;
- ☐ **отрицательную реакцию** (отсутствие кольца) знаком - (минус).

Непосредственно перед постановкой реакции необходимо проверить её компоненты.

Для этого ставят контроли:

- 1) сибирезвенный антиген + преципитирующая сибирезвенная сыворотка — реакция должна быть положительной;
- 2) сибирезвенный антиген + нормальная сыворотка лошади — реакция должна быть отрицательной;
- 3) физраствор + преципитирующая сибирезвенная сыворотка — реакция должна быть отрицательной.

В настоящее время применяют также реакцию преципитации в агаровом геле.

Задание 6. Ознакомьтесь с методикой постановки реакции агглютинации с бруцеллёзным Роз-бенгал антигеном (РБП).

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз бенгал антигеном применяют при исследовании сыворотки крови у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, верблюдов, северных оленей. Ее преимущества перед классической реакцией агглютинации состоят в простоте и скорости выполнения. Для постановки реакции пригодны прозрачные сыворотки, без эритроцитов.

Бруцеллезный антиген для пластинчатой РА — это взвесь в буферном растворе клеток *Br. abortus штамма № 19*, инаktivированных нагреванием и фенолом и окрашенных бенгальской розовой в малиново-розовый цвет. При отсутствии этого антигена можно использовать для занятий обычный бруцеллезный антиген для РА и РСК (РДСК).

Ставят реакцию на чистых металлических эмалированных пластинках или израсцовых плитках с лунками при температуре 18—30°C. На бортиках пластинки против каждой лунки записывают номер испытуемой сыворотки.

В начале работы ставят контроль антигена с негативной и позитивной агглютинирующими сыворотками в тех же дозах, а также контроль на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физраствора).

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки при помощи специального шприца-полуавтомата или микропипетки. При исследовании сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов и свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят пипеткой 0,03 мл (две капли) антигена, а при исследовании сыворотки крови овец, коз и северных оленей — 0,015 мл (одну каплю). Затем антиген тщательно смешивают с каждой каплей сыворотки активными движениями до получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунок. Пластины покачивают 4 мин, затем учитывают реакцию, слегка наклонив пластину. Агглютинацию, которая происходит позже, не учитывают.

Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена в виде хлопьев розового цвета на белом фоне лунки. Если смесь остается гомогенной (агглютинация отсутствует) — **реакцию считают отрицательной**.

Все сыворотки, с которыми получена положительная РБП в тот же или на другой день исследуют в **РА и РСК (РДСК)**. Оценку «сомнительная» дают только при положительной РБП и отрицательных **РА и РСК** - Во всех остальных случаях результаты оценивают как положительные.

Сыворотки крови, с которыми в РБП получен отрицательный результат дополнительно путем РА и РСК не исследуют. Животных, давших сомнительную реакцию повторно исследуют РБП, РА и РСК (РДСК) через 15—30 дней. В случае положительного или сомнительного результата при повторном исследовании сывороток диагностическая оценка считается положительной.

5. Вопросы выходного контроля:

- 5.1. Какие питательные среды используются для выращивания бактерий и способ их приготовления.
- 5.2. В чем заключаются меры личной профилактики при работе с микробными культурами, патологическим материалом.
- 5.3. Какое практическое значение иммунитета в противоэпизоотической работе.
- 5.4. Что такое серологические реакции и их значение в диагностике скрытых инфекций.
- 5.5. В чём заключается сущность иммунитета.
- 5.6. Какова техника заражения лабораторных животных, и с какой целью ставится биопроба?

Литература:

1. Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2017 стр. 177-178.
2. Эпизоотология и инфекционные болезни: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2015 стр.17-18
3. Материал на электронном образовательном ресурсе: