

Інструкційно - технологічна картка
для проведення лабораторного заняття № 4
з навчальної дисципліни: "Епізоотологія з мікробіологією".

Тема заняття. Виготовлення і забарвлення мазків.

Місце проведення: лабораторія епізоотології з мікробіологією.

Тривалість заняття: 90 хв.

Мета проведення заняття.

Набути навичок у виготовленні мазків із непатогенних бактеріальних культур та забарвленні їх різними способами.

Матеріальне оснащення робочого місця.

Предметні і накривні скельця, олівці для написання по склу, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, дистильована вода, культури мікробів, спиртівки, мікроскоп та імерсійна олія, вата, виготовлений мазок, забарвлені препарати з непатогенних бактеріальних культур.

Правила охорони праці.

Під час проведення лабораторного заняття необхідно пам'ятати:

1. Виконувати роботу, передбачену завданнями.
2. Працювати в санодязі та дотримуватись правил особистої гігієни.
3. Не торкатися руками нагрітих приладів, щоб уникнути опіків.
4. Робоче місце тримати в чистоті.
5. По закінченню роботи прибрати робоче місце.

Методичні вказівки щодо виконання і оформлення.

Викладач знайомить здобувачів освіти з способами виготовлення мазків, методикою виготовлення розчинів барвників, різними способами забарвлення. Викладач розділяє групу студентів на підгрупи, які самостійно виготовляють мазок. Виготовлені мазки здобувачі забарвлюють простим способом та знайомляться з складними способами забарвлення. Здобувачі освіти проводять мікроскопію під керівництвом викладача та замальовують схему мазка.

Зміст і послідовність виконання завдання:

1. Виготовлення мазків із непатогенних бактеріальних культур.
2. Забарвлення препаратів простим способом.
3. Ознайомлення із складними способами забарвлення.

Після виконання завдання здобувач освіти повинен:

Знати	Вміти
1. Основні правила виготовлення мазка. 2. Висушування і фіксацію мазка. 3. Правила простого забарвлення. 4. Способи складних методів забарвлення.	1. Виготовити мазок. 2. Висушити мазок. 3. Зафіксувати і зафарбувати мазок. 4. Провести мікроскопію мазка.

Захист практичних завдань. Перевірка робочих зошитів.

1. З яких етапів складається виготовлення мазків?
2. Як висушують мазок?
3. З якою метою проводять фіксацію мазка?
4. Як виготовляють барвники для простого забарвлення?
5. Як проводять забарвлення за Грамом?

Домашнє завдання:

1. Постой В.П. Епізоотологія з мікробіологією. - К.: Вища освіта, 2006. С. 27 – 28.
2. Ярчук Б.М., Паска М.М., Корнієнко Л.Є. та ін.: За ред. Ярчука Б.М. Практикум із загальної епізоотології. – Біла Церква.: БДАУ. С.43 - 45.

Хід виконання:

1. Виготовлення препаратів з органів і мазків з непатогенних бактеріальних культур.

Виготовлення мазків складається з трьох етапів:

- 1 - виготовлення мазка;
- 2 - висушування мазка;
- 3 - фіксація мазка.

Мазки виготовляють на предметних стеклах, які повинні бути чистими. *Стекла для виготовлення мазків готують так:* нові, що не були у дії, кип'ятять в 1-2% розчині соди, потім промивають водою і слабим розчином соляної кислоти і знову водою. Стекла, що їх використовували, спочатку вміщують на 2 години в концентровану сірчану кислоту /або в суміш -100 частин сірчаної кислоти 50 частин двохромового кислого калію і 1000 частин води/ після чого кип'ятять в лузі, а потім добре промивають водою. Підготовленні таким способом стекла зберігають у склянках з притертими пробками у суміші спирт-ефіру, або ж після обробки спиртом їх зберігають сухими у закритих склянках.

Виготовлення мазка. Мазок повинен бути тонким, за формою округлим, або овальним, розміром 1-2 см і розміщуватися у центрі предметного скла. Наносять коло олівцем для писання по склу. На скло наносять невелику краплю води, в яку вміщують бактеріологічною петлею невелику кількість досліджуваного матеріалу. Коловими рухами петлі матеріал розтирають у воді, щоб досягти тонкого рівномірного мазка. Якщо мазок роблять з культури в рідкому середовищі то краплі води не потрібно. В такому випадку краплю культури для мазка беруть і бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Відразу ж, після використання бактеріологічну петлю пропалюють на полум'ї спиртівки, а піпетку опускають у дезінфікуючу рідину.

Висушування мазка. Виготовлений мазок висушують на повітрі або ж над паяльником у струмені теплого повітря, при цьому предметне скло держать за краї великим і вказівним пальцями, догори мазком, середній палець під склом - це дає можливість регулювати ступінь нагрівання, щоб не допустити осідання білка бактерій - порушення їх структури.

Фіксація мазка. Фіксація мазка проводиться з метою : 1- знешкодження мікробів; 2- прикріплення мазка до скла; 3- зробити мікробів більше сприйнятливими до забарвлення. Вбиті мікроби краще забарвлюються, ніж живі. Існує кілька способів фіксації.

Найпоширенішим способом фіксації є нагрівання мазка на полум'ї пальника. Висушений препарат мазком догори проводять повільно 3-4 рази (2с) над полум'ям пальника. Як недостатня, так і надмірна фіксація мазка негативно відбивається на його виготовленні і чіткості мікрокартини. При недостатній фіксації мазок змивається, а при надмірному перегріванні змінюється структур клітин.

Мазки відбитки з органів. Ділянку органа, звідки збираються робити мазок, припікають нагрітим шпателем. Потім стерильним скальпелем або ножицями вирізають невеликий шматочок досліджуваного органа, захоплюють його пінцетом і притискають до предметного скла. Виготовленні мазки висушують і фіксують.

Дослідження живих бактерій проводять методами «висячої» та «роздавленої» крапель (в основному для встановлення їх рухомості).

Висяча крапля. Краплю досліджуваного матеріалу наносять на середину накривного, скла. Потім накривне скло швидко повертають вниз і накладають на предметне скло з заглибиною всередині. Крапля повинна вільно звисати в глибину, не доторкуючись до її дна і країв. Краї заглибин на предметному склі треба попередньо змазати вазеліном. Цей метод дає можливість виявити ряд властивостей мікробів, що їх не вдається знайти у вбитих мікробів, наприклад їх активну рухливість та ін.

Роздавлена крапля. На предметне скло петлею або піпеткою наносять краплю досліджуваного матеріалу і покривають накривним склом, не допускаючи при цьому утворення пухирців повітря. Препарат досліджують зразу після виготовлення. Краще мікроскопувати мазки з висячою і роздавленою краплею в мікроскопі з темним полем зору.

2. Забарвлення препаратів простим способом.

Барвники, що застосовуються у мікробіологічній практиці, виготовляють із кам'яновугільної смоли. Їх називають аніліновими барвниками. Вони мають вигляд порошку або кристалів.

Просте забарвлення полягає в тому, що при забарвленні застосовують лише один барвник, найчастіше *фуксин* або *метиленовий синій*.

Фуксин забарвлює швидше (1-2 хв.) й інтенсивніше: він забарвлює однаково всі види бактерій.

Метиленовий синій забарвлює повільніше (3-5 хв.), менш яскраво, але препарати виходять кращі, крім того він дає забарвлення різної інтенсивності у різних бактерій.

Забарвлення здійснюється так: на фіксований мазок на певний час наносять кілька крап барвника (фуксин, метиленовий синій), потім мазок промивають дистильованою водою і висушують фільтрувальним папером або на повітрі. Барвники використовують у розчинах.

Виготовлення розчинів барвників для простого забарвлення.

Фуксин Циля виготовляють у вигляді концентрованого розчину на карболовій воді. Він дуже стійкий і придатний для забарвлення протягом багатьох місяців. У такому вигляді його застосовують тільки для мікробів, які важко сприймають барвники (для кислотостійких бактерій, для спор). Для забарвлення більшості бактерій фуксин Циля розводять в 10 разів дистильованою водою (водний фуксин). Розведений фуксин дуже не стійкий, і тому виготовляють його безпосередньо перед використанням.

Карболовий фуксин: 1 г фуксину (основного), кислоти карболової кристалічної 1, спирту 96⁰ 10 мл, гліцерину кілька крапель, дистильованої води 100 мл. Порошок фуксину розтирають з карболовою кислотою і гліцерином, одночасно доливають невелику кількість спирту. Коли суміш перетвориться на кашкоподібну масу, додають дистильовану воду. Суміші дають відстоятися протягом двох діб і фільтрують її.

Водний фуксин. Карболового фуксину 1 мл., дистильованої води 9мл.

Метиленовий синій. Насичений розчин метиленового синього виготовляють заздалегідь. До 10 г метиленового синього добавляють 100 мл спирту 96⁰. З цього розчину готують лужний метиленовий синій Леффлера. Беруть 30 мл профільтрованого спиртового розчину метиленового синього, 1 мл 1% їдкого натру або їдкого калію і розчиняють в 100 мл дистильованої води.

3. Ознайомлення з складними способами забарвлення мазків.

Складні способи забарвлення бактерій ґрунтуються на особливостях фізико хімічної будови мікробної клітини. Їх застосовують для вивчення будови і диференціації мікробів. Найбільше практичне значення має забарвлення за Грамом, Циль-Нільсеном і Козловським.

Забарвлення за Грамом. Цей спосіб забарвлення є універсальним тому, що його застосовують для всіх мікробів. Всі бактерії, залежно від реакції їх на цей спосіб забарвлення поділяють на грампозитивні і грамнегативні. Для забарвлення за Грамом потрібні такі розчини барвників:

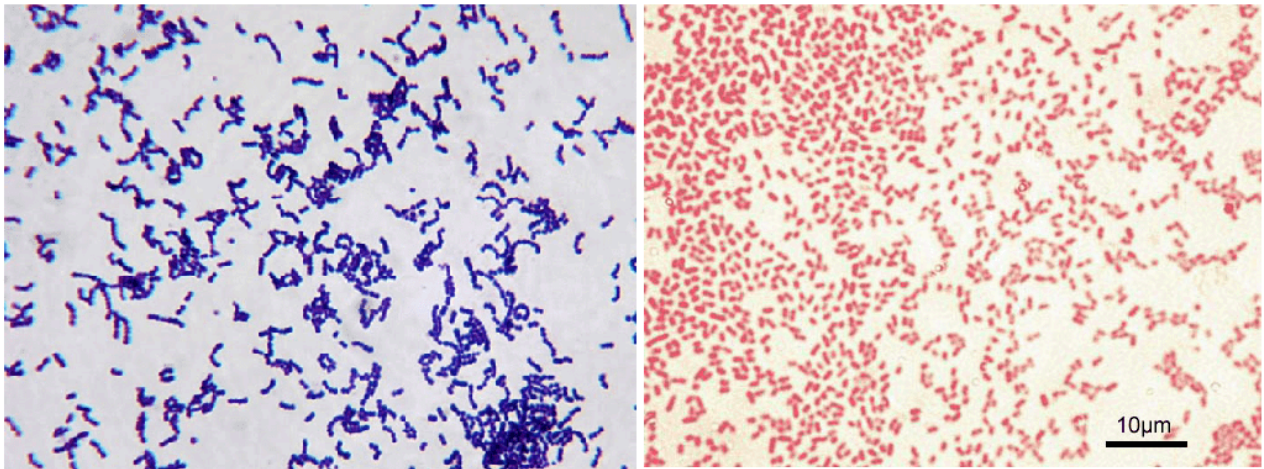
1. Карболовий генціанвіолет -1г кристалічного генціанвіолету розчиняють в 10 мл 96⁰ спирту ректифікату. До нього додають 100 мл 2% водного розчину карболової кислоти і фільтрують.
2. Розчин Люголя (йоду кристалічного 1 г, йодистого калію 2 г, води дистильованої 300 мл). Спочатку розчиняють у кількох мл води йодистий калій, потім додають кристалічного йоду, після розчинення доливають дистильовану воду до 300 мл і фільтрують.

Техніка забарвлення. На фіксований мазок кладуть смужку фільтрувального паперу, за розміром трохи вужчу і коротшу від предметного скла і наносять кілька крапель карболового розчину генціанвіолету на 2хв. Потім зливають барвник і знімають папір, не промиваючи водою наносять на препарат розчин Люголя на 2 хв. Після почервоніння мазка розчин Люголя зливають і знебарвлюють 96⁰ спиртом, занурюють препарат в склянку з спиртом на 30 сек. Далі препарат промивають водою, підсушують і дофарбовують додатково спиртово – водним фуксином (для цього карболовий фуксин розбавляють водою 1:10) впродовж 2хв. Після цього фарбу зливають, препарат змивають водою, висушують і досліджують під мікроскопом.



Рис.1 Набір для фарбування мазків по Граму (розчини генціанвіолету, Люголя, фуксин Циля).

Рис. 2. *Мікрокартина*: грампозитивні мікроби забарвлюються у темно-фіолетовий, а грамнегативні у рожевий колір.



Gram Positive Bacteria

Gram Negative Bacteria

Забарвлення за Циль-Нільсеном. Застосовують для виявлення кислотостійких мікробів. До них належать збудники туберкульозу, паратуберкульозу та ін. Для забарвлення застосовують такі барвники : фуксин карболовий основний (виготовляють так, як і при забарвленні за Грамом), 5%розчин сірчаної кислоти, 5% розчин азотної або 3% розчин соляної кислоти, 96⁰ спирт-ректифікат, метиленовий синій Леффлера (до 100 мл дистильованої води додають 1 мл 1% розчину їдкого калію і 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього). Барвник фільтрують.

Техніка забарвлення. На фіксований мазок кладуть смужку фільтрувального паперу (за розміром предметного скла) і наливають карболовий фуксин Циля. Мазок з барвником 2-3 рази підігривають, тримаючи високо над полум'ям пальника до появи пари і щоразу відставляючи препарат для охолодження. Дають препарату охолонути, знімають папірець, зливають барвник і промивають препарат водою. Знебарвлюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти (занурюють у склянку з кислотою 2-5 рази, не затримуючи в кислоті).

Препарат старанно промивають водою і додатково забарвлюють метиленовим синім протягом 3-5 хвилин.

Мікрокартина: кислотостійкі бактерії забарвлюються в рубіново-червоний, інші складові частини мазка і не кислотостійкі мікроби - в синій колір.

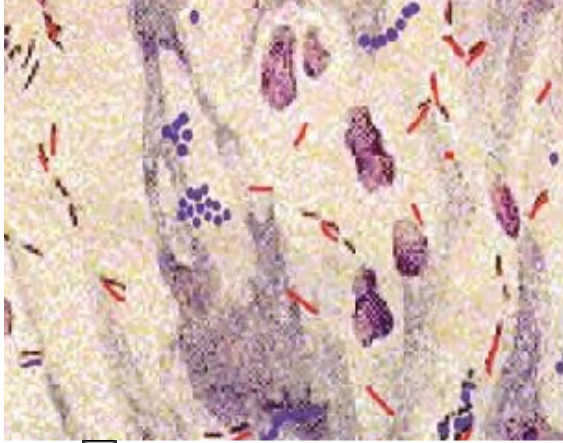


Рис. 15. *M. tuberculosis* у мокротинні, фарбування за Цилем-Нільсеном

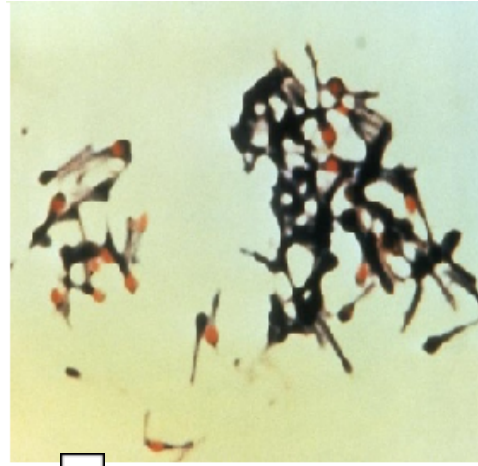


Рис. *Clostridium tetani*, фарбування за методом Ціля-Нільсена

Забарвлення бруцел за Козловським. Застосовують для мікроскопічної діагностики бруцельозу. На фіксований мазок наносять 2% розчин сафраніну і підігрівають 2 хв. Потім препарат промивають водою і дозбарвлюють (без підігрівання) 0,75-1% розчином брильянтового зеленого протягом 30 - 60 сек., далі промивають водою і висушують.

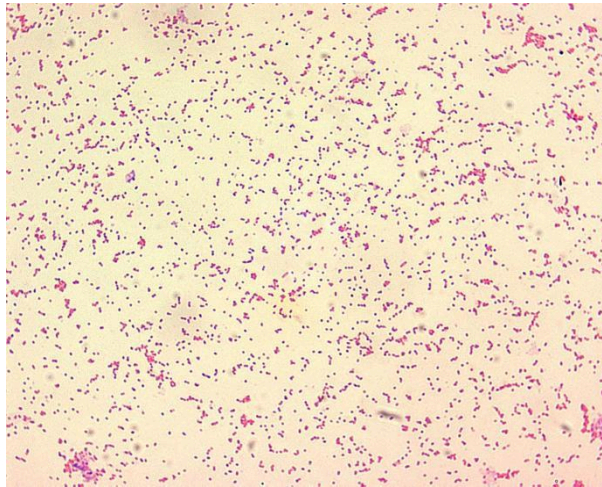


Рис. 5. *Мікрокартина:* бруцели забарвлюються у червоний колір, а фон препарату і інші мікроби в зелений.