

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

Лабораторная работа № 2

Тема: Приготовление и фиксация мазков. Приготовление красящих растворов. Простые и сложные методы окраски мазков. Окраска спор и капсул.

Цель: выработайте навыки по приготовлению красящих растворов, мазков, и их фиксации. Овладейте техникой микроскопирования мазков.

Время выполнения: 2 часа.

Место проведения: аудитории 419, 426 или бактериологический отдел районной ветлаборатории.

Дидактическое и методическое обеспечение: непатогенные культуры микробов, кусочки внутренних органов животного, предметные и покровные стёкла, бактериологические петли, пастеровские пипетки, ножницы, шпатель, карандаши по стеклу, песочные часы, иммерсионное масло, микроскопы, спирты (метиловый и этиловый), набор готовых красок (карболовый раствор генцианвиолета, люголевский раствор, спирт-ректификат, карболовый фуксин, спиртовки. Таблицы зооантропонозных болезней, основных форм бактерий, окраска по Грамму и устройство микроскопа.

Охрана труда на рабочем месте (отдельная инструкция)

Порядок и последовательность выполнения работы:

1. Внеурочная подготовка.

1.1. Самостоятельно подготовьтесь к лабораторной работе.

Изучите теоретический материал по учебнику Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; - Минск: РИПО, 2017 стр. 3-20.

Практикум Эпизоотология и инфекционные болезни: учеб. пособие /В.В.Максимович и др; - Минск: ИВЦ Минфина, 2015. стр. 5-13.

1.2. Подготовьте рабочую тетрадь.

1.3. Изучите инструкцию по охране труда.

2. Работа в лаборатории.

2.1. Пройдите входной контроль.

2.2. Подготовьте рабочее место и оборудование для работы.

2.3. Изучите методические указания и выполните задания:

Задание № 1. Ознакомьтесь с правилами личной профилактики при работе с патологическим материалом и больными животными.

Задание № 2. Ознакомьтесь с правилами обращения с животными больными инфекционными болезнями.

Задание № 3. Изучите методику приготовления мазков из культур микробов.

Задание № 4. Изучите методику приготовления мазков отпечатков из органов.

Задание № 5. Ознакомьтесь с методикой и правилами фиксации мазков.

Задание № 6. Изучите простые и сложные методы окраски мазков.

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. Ознакомьтесь с правилами личной профилактики при работе с патологическим материалом и больными животными.

1. Меры личной профилактики

При работе с патологическим материалом и больными животными внимание специалиста ветеринарной медицины сосредотачивается на двух основных моментах:

- 1.) Предупредить заражение людей.
- 2.) Не допустить распространение возбудителя инфекции.

Существует целый ряд инфекционных болезней животных, которыми может заразиться человек (зооантропонозы). К ним относятся сибирская язва, туберкулёз, лептоспироз, сап, бруцеллёз, бешенство, ящур, туляремия, сальмонеллёз и др.

Заражение человека этими болезнями может произойти:

1. При клиническом осмотре животных и оказании им лечебной помощи.
2. При вскрытии и взятии патологоанатомического материала для лабораторных исследований.
3. При проведении прививок и диагностических исследований.
4. При работе с патологоанатомическим материалом в лабораториях.
5. При соприкосновении с не обезвреженным сырьём животного происхождения, кожа, шерсть, перо).
6. При переработке мясных и молочных продуктов.
7. При употреблении в пищу инфицированных продуктов животного происхождения.

Для того чтобы предохранить себя и других от заражения инфекционной болезнью и не допустить её распространения необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- Приступать к работе с патологическим материалом и больными животными разрешается только после инструктажа.
- Все работы с больными животными и патологическим материалом выполняют в защитной одежде: халате, колпаке и косынке. При необходимости надевают нарукавники, передники, резиновые перчатки, резиновые сапоги, очки и защитные марлевые маски.
- Людей, имеющих повреждения кожи рук, к работе с патологическим материалом не допускают. При необходимости работу проводят только в резиновых перчатках, царапины и трещины на руках смазывают настойкой йода и заливают колодием.
- При работе с патологическим материалом нельзя курить, разговаривать, касаться лица руками, поправлять волосы, отвлекаться от работы. В лаборатории запрещается хранение и приём пищи.

- Руки после работы погружать в сосуд с дезинфицирующей жидкостью (2% раствор карболовой кислоты) на 1-2 минуты, затем тщательно моют с мылом.
- Использованные в работе пипетки, предметные стёкла и покровные стекла, куски ваты и т.п. тот час же помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью (5% раствор карболовой кислоты, 3% раствор лизола и др.). Металлические предметы немедленно обезвреживают прокаливанием над пламенем, инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты) после употребления кипятят или автоклавируют.
- Если патологический материал попал на окружающие предметы, необходимо немедленно провести тщательную дезинфекцию.

Меры против заражения при попадании патологического материала в организм человека:

- а) при ранениях и инфицированным инструментом или при укусе животным не следует торопиться с остановкой кровотечения, рану нужно прижечь настойкой йода и наложить спиртовую повязку (40-60% спирт).
- б) при попадании патологического материала в рот его немедленно выплёвывают в чашку с дезинфицирующим раствором а рот прополаскивают слабым раствором йода (3-5 капель настойки йода на стакан воды) или перманганата калия в течение нескольких минут.
- в) при попадании патологического материала в глаза, их нельзя тереть. Глаза следует промыть слабым раствором йода или перманганата калия.

Задание № 2. Ознакомьтесь с правилами обращения с животными больными инфекционными болезнями.

1. Любая работа с больными и в особенности с подозрительными по заболеванию заразными болезнями животными проводится только в защитной одежде.
2. Исследование больного животного начинается из предварительного ознакомления (регистрацию, сбор анамнестических и эпизоотологических данных).
3. Собственно исследование (общее и специальное) проводят после предварительного наблюдения за животными и беглого клинического осмотра.
4. Соблюдение осторожности при оказании лечебной помощи больным животным
5. Больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют от остального поголовья.

Задание № 3. Изучите методику приготовления мазков из культур микробов.

Приготовление мазков из культур микробов

Мазки приготавливают на чистых обезжиренных предметных стеклах, непосредственно перед приготовлением мазка предметное стекло провести через пламя горелки.

Перед приготовлением мазка нужно:

- Предохранить культуру от загрязнения микробами из окружающей среды;
- Не допустить инфицирования этой культурой окружающих предметов.

Предметное стекло кладут на стол около зажженной спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку и удерживают в наклонном положении большим, указательным и средним пальцами.

Материал из культуры берут прокаленной на пламени горелки бактериологической петлей и стерильной пастеровской пипеткой. Петлю или пипетку удерживают в правой руке. Этой же рукой над пламенем спиртовки открывают пробирку, вынимают ватную пробку и зажимают её мизинцем к ладони. Открытый конец пробирки обжигают на пламени, прожженную петлю вводят в пробирку, не касаясь краёв. Остудив петлю, захватывают ею каплю культуры.

При пользовании пастеровской пипеткой тонкий конец её обламывают и насасывают культуру, пользуясь при этом резиновой грушей (а не ртом!). Закрывают пробирку ваткой пробкой также над пламенем спиртовки. Взятый материал наносят на предметное стекло, размазывая тонким слоем. Петлю прокаливают и ставят в штатив.

При изготовлении мазков из плотных культур на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильной жидкости (физраствора). Взятый бактериологической петлей с агаровой среды материал тщательно размазывают по стеклу.

Задание № 4. Изучите методику приготовления мазков отпечатков из органов.

Участок органа, откуда предполагается сделать отпечатки, прижигают шпателем или обжигают на пламени.

Стерильными ножницами вырезают небольшой кусочек исследуемого органа и с помощью пинцета прижимают поверхность разреза к предметному стеклу, делая несколько отпечатков. Каждый мазок с обратной стороны стекла обводят карандашом по стеклу и делают надпись (№ и дату изготовления).

Приготовленные мазки высушивают на воздухе. Ускорить сушку можно осторожно, подогревая на пламени спиртовки.

Задание № 5. Ознакомьтесь с методикой и правилами фиксации мазков.

Высушенные мазки фиксируют физически или химическим способом. Физическая фиксация достигается 3-4-х кратным проведением мазка над пламенем спиртовки. Перегрев стекла недопустим. Контроль осуществляется путем приложения мазка к тыльной стороне ладони (не должно вызывать чувство жжения). Химические способы. Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующими веществами (этиловый спирт 96% - 10-15 мин, метиловый спирт - 5 мин, жидкость Никифорова - 10-15 мин, жидкость Карнуа 10-15 мин).

Цель фиксации:

1. обезвреживание микробов;
2. прикрепление к стеклу.

Задание № 6. Изучите простые и сложные методы окраски мазков.

Окраска простым методом.

На фиксированный мазок на 1-2 мин наливают несколько капель раствора карболового фуксина в разведении 1:10 или метиленовой синьки.

Затем краску смывают дистиллированной водой и мазок высушивают фильтровальной бумагой.

Простыми способами окраски пользуются для обнаружения в микроскопируемом материале микробов, определения их количества, формы и расположения.

Сложные методы окраски мазков.

Окраска мазков по Грамму.

Методика окраски:

1) мазок, фиксированный на огне, окрашивают через фильтровальную бумагу основным красителем - раствором генцианвиолета.

Окрашивание длится 1-2 мин.

2) снимают бумагу, сливают избыток красителя и, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1 мин.

3) раствор Люголя сливают и препарат в течение 30 секунд обрабатывают спиртом-ректификатом;

4) препарат тщательно промывается водопроводной водой;

5) дополнительно окрашивается препарат спирто-водным раствором фуксина в течение 2 мин.

Смыв краску водой и высушив мазок, произведите его микроскопию.

Результаты окраски:

Грамположительные бактерии окрашиваются основным красителем (генцианвиолетом) в темно-фиолетовый цвет.

Грамотрицательные бактерии, принимая дополнительную окраску (фуксин) после обработки спиртом-ректификатом, приобретают ярко-малиновый, розовый или рубиновый цвет.

5. Вопросы выходного контроля:

5.1. Какие структурные компоненты присущи бактериальной (прокариотической) клетке:

а) основные структуры

б) временные структуры, которые клетка несет лишь на определенном этапе жизненного цикла

5.2. На чем основан метод окрашивания микробов, предложенный в 1864 году Грамом. Какое практическое значение данного метода.

5.3. В чем сходство микоплазмы и бактерий, и в чем их различие.

5.4. В чем особенности строения микроскопических грибов.

5.5. Какие виды микроорганизмов образуют споры, в чем биологическая сущность спор.

5.6. Как приготовить мазок - отпечаток из органов и тканей.

5.7. Ряд бактерий способны образовать капсулы. В чем биологическая сущность процесса капсулообразования, его практическое значение.

5.8. Какие вы знаете морфологические формы бактерий.

5.9. К какой морфологической группе микроорганизмы, имеющие следующие признаки: - величина от 0,1 до 20 микрометров, изогнутость в форме запятой или полумесяца.

Литература:

1. Учебник Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; - Минск: РИПО, 2017 стр. стр.187-204, стр. 223-236.
2. Практикум Эпизоотология и инфекционные болезни: учебное пособие /В.В.Максимович и др; - Минск: ИВЦ Минфина, 2015. стр. 62-108.
3. Электронный образовательный ресурс: Эпизоотология goreglad.blogspot.com.