



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
БАШКИРСКАЯ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ

УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ

Лабораторно-практическое занятие. **Бактериологическое исследование
мяса. Методы окраски мазков**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Специальность: Ветеринария

Курсы повышения квалификации по теме: **«Ветеринарно-санитарная
экспертиза, лабораторные исследования пищевой продукции и сырья
животного и растительного происхождения».**

Категория слушателей: ветеринарные специалисты ветлабораторий.

УДК 619:614

ББК

Рекомендованы к изданию Учебно-методическим советом Учебного центра ДПО ГБУ Башкирская НПВЛ (протокол № 7 от « 20 » мая 2016 г.)

Составитель: зав. отделом бактериологии, паразитологии и микологии Файзуллина М.Ю.

Рецензент: заместитель директора, заведующий отделом метрологии и информационного обеспечения ГБУ Башкирская НПВЛ, к.в.н., доцент Буканов А.М.

Ответственный за выпуск: руководитель Учебного центра ДПО ГБУ Башкирская НПВЛ, к.в.н., доцент Багданова О.С.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА.

МЕТОДЫ ОКРАСКИ МАЗКОВ

Цель занятия: овладеть лабораторными методами бактериологического исследования мяса, способами окраски мазков.

Категория слушателей курсов: ветеринарные специалисты ветлабораторий.

Слушатели курсов должны знать:

1. Лабораторное оборудование, лабораторную посуду, приборы и их назначение, питательные среды.
2. Приготовление реактивов, бактериальных красок.
3. Методы бактериологического анализа мяса.
4. Правила оформления сопроводительных документов и актов отбора проб.

Слушатели курсов должны уметь работать с лабораторным оборудованием и самостоятельно выполнять лабораторное исследование мяса и окрашивать мазки.

Вид занятия и место проведения: Лабораторно-практические занятия проводятся подгруппами не более 15 человек.

Место проведения - учебная аудитория и рабочий кабинет ГБУ Башкирская НПВЛ.

Объекты исследования: пробы мышц, лимфатических узлов, паренхиматозные органы.

Оборудование, приборы: согласно ГОСТа.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА

Убой животных – умерщвление животных с последующей обработкой туш. Целью убоя животных обычно является употребление в пищу и переработка частей туш для использования в промышленности (например, выделка кож), фармакологии и других отраслях хозяйства.

Под «вынужденным убоем» понимают лишение жизни больного животного ввиду нецелесообразности или неэффективности его дальнейшего лечения с целью недопущения падежа.

К случаям вынужденного убоя не относят:

- 1) убой клинически здоровых животных с нормальной температурой тела, не поддающихся откорму до требуемых кондиций; отстающих в росте и развитии; яловых; низкопродуктивных;
- 2) убой здоровых животных, которым угрожает гибель и которых вынуждены убить в результате стихийного бедствия (наводнение, землетрясение, снежные заносы на зимних пастбищах и т. д.);
- 3) убой здоровых животных, получивших травму перед убоем на мясокомбинате, бойне, скотобойном пункте или убойной площадке.

Бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов проводят во всех случаях, предусмотренных разделами 3,4 и п Правил ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов от 27.12.1983 г. с дополнениями от 17.06.1988 г. для решения вопроса их использования.

Бактериологическое исследование также проводят:

1. Во всех случаях вынужденного убоя животных независимо от причин убоя, в т. ч. при отравлениях или подозрении на отравление ядами, а также при подозрении, что мясо получено от больных животных или убитых в состоянии агонии.
2. При желудочно-кишечных заболеваниях дыхательных органов, гнойных нефритах, нефрозах, при септико-пиемических заболеваниях, при обнаружении серозных и фибринозных перикардитов у свиней, а также при подозрении на наличие сальмонелл.
3. При удалении кишечника из туши позднее двух часов после убоя животного.

4. При наличии сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Бактериологический анализ мяса проводится согласно ГОСТа 21237-75. Настоящий стандарт распространяется на мясо и субпродукты от всех видов убойного скота и устанавливает методы бактериологического исследования для выявления в них:

Аэробных бактерий:

- бацилл сибирской язвы
- бактерий из рода сальмонелл
- бактерий из рода кишечной палочки – эшерихий
- бактерий из рода протей
- бактерии рожи свиней
- бактерий листериоза
- бактерий пастереллеза
- бактерии из группы кокков

Анаэробных бактерий:

- патогенных и токсигенных клостридий

МЕТОДЫ ОКРАСКИ МАЗКОВ

Сущность метода

Комплекс методов и приемов, применяемый для изучения морфологических свойств микроорганизмов. Окрашивание бактерий производится как для обнаружения их в исследуемом материале при бактериоскопической диагностике, так и для их идентификации после выделения чистой культуры из исследуемого материала при бактериологическом исследовании.

Проведение испытания

Окраска мазков по Граму (общепринятая модификация)

На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет. Выдерживают 1-2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску, мазок промывают дистиллированной водой и наливают раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1-2 мин раствор сливают и наливают этиловый спирт на 0,5-1 мин. Затем мазок промывают

водой и дополнительно окрашивают водным фуксином или водным раствором сафранина в течение 1-2 мин. Затем промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

Обработка результатов

При правильной окраске мазков по Граму микробы грамположительные будут окрашены в темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

Окраска капсул методом Ребигера

Мазки окрашивают и фиксируют одновременно. Готовят раствор: 15-20 г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40%-ного формалина. Раствор оставляют на 8-10 ч при температуре 20 °С, фильтруют, после чего он готов к употреблению. Окрашивают нефиксированные мазки в течение 15-20 с, быстро промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Обработка результатов

Капсулы – красновато-фиолетовые, бактерии – темно-фиолетовые.

1. Бактериоскопическое исследование

Сущность метода

Метод основан на определении наличия микроорганизмов в исследуемом материале.

Проведение испытания

Из мышц, лимфатических узлов, паренхиматозных органов (печени, почек, селезенки) готовят 2-10 мазков-отпечатков.

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают одновременно и по Граму и раствором Ребигеру.

Обработка результатов

При бактериоскопии мазков, прежде всего, обращают внимание на наличие возбудителя сибирской язвы. Наличие в мазках грамположительных палочек с обрубленными концами, а при окраске по Ребигеру – палочек или цепочек с капсулами, дает предварительное

заклучение об обнаружении (бактериоскопически) микробов, характерных для возбудителя сибирской язвы.

2. Метод выявления бацилл сибирской язвы

Сущность метода

Метод заключается в определении их характерной морфологии, характера роста на питательных средах и выявлении патогенности путем заражения лабораторных животных.

Проведение испытания

1. Бактериоскопия мазков из материала.

Окраска мазков по Граму

На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет. Выдерживают 1-2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску, мазок промывают дистиллированной водой и наливают раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1-2 мин раствор сливают и наливают этиловый спирт на 0,5-1 мин. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают водным фуксином или водным раствором сафранина в течение 1-2 мин. Затем промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

Окраска капсул методом Ребигера

Мазки окрашивают и фиксируют одновременно. Готовят раствор: 15-20 г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40%-ного формалина. Раствор оставляют на 8-10 ч при температуре 20 °С, фильтруют, после чего он готов к употреблению. Окрашивают нефиксированные мазки в течение 15-20 с, быстро промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

2. Посев на питательные среды, изучение свойств чистой культуры на питательных средах.

3. Постановка РТП.

2 г материала нарезают в пробирку и заливают 10 мл карболовизированного 0,5%-ного физиологического раствора. Выдерживают в термостате в течение 18-24 ч при температуре 37 °С. Затем экстракт кипятят 30-40 мин и фильтруют через асбестовую нейтральную вату до полной прозрачности. 0,25-0,3 мл экстракта вносят в узкую пробирку, наслаивая на сибиреязвенную преципитирующую сыворотку.

4. Биологическая проба на лабораторных животных.

Часть исходного материала растирают в ступке со стерильным песком и небольшим количеством физиологического раствора. 0,5 мл взвеси вводят двум белым мышам под кожу в области спины.

Обработка результатов

В мазках из материала – капсулообразующие палочки, из колоний, выросших на питательных средах – грамположительные палочки, расположенные в виде длинных цепочек.

На мясо-пептонном агаре бациллы сибирской язвы растут в виде серо-белых шероховатых с бахромчатыми краями колоний, напоминающих под лупой «львиную гриву». На мясо-пептонном бульоне – крупные хлопья, оседающие на дно пробирки, с образованием осадка, напоминающего комок ваты, бульон остается прозрачным.

Положительная реакция преципитации – на границе сыворотки и экстракта через 3-8 мин появляется преципитирующее кольцо; сомнительная – кольцо появляется через 10-15 мин; отрицательная – отсутствие кольца.

Гибель белых мышей наблюдается через 24-72 ч.

Метод выявления бактерий рожи свиней, листериоза и пастереллеза

Сущность метода

Метод заключается в определении специфического роста этих микроорганизмов на мясо-пептонном агаре и их дифференциации по морфологическим, культуральным и биологическим свойствам.

Проведение испытания

1. Бактериоскопия мазков из культур.

Окраска мазков по Граму

На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет. Выдерживают 1-2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску, мазок промывают дистиллированной водой и наливают раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1-2 мин раствор сливают и наливают этиловый спирт на 0,5-1 мин. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают водным фуксином или водным раствором сафранина в течение 1-2 мин. Затем промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

2. Посев на питательные среды, изучение свойств чистой культуры на питательных средах.

3. Проведение пробы на каталазу.

К суточной культуре добавляют 1 мл 10%-ного раствора перекиси водорода.

4. Постановка конъюнктивальной пробы на морской свинке.

На конъюнктиву глаза морской свинки наносят 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном.

Обработка результатов

Наименование показателей	Характеристика бактерий		
	рожи свиней	листерии	пастереллы
мазки-отпечатки	тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки, иногда нити	короткие палочки с закругленными концами. Располагаются поодиночке, попарно, в форме римской цифры V или в виде полисада	мелкие, биполярно окрашенные палочки
окраска по Граму	положительная	положительная	отрицательная
рост на МПА	мелкие, росинчатые, прозрачные колонии	мелкие, росинчатые, прозрачные колонии	мелкие, росинчатые, слегка опалесцирующие прозрачные колонии
рост на МПБ	легкое помутнение, поднимающийся при встряхивании осадок	небольшое помутнение с образованием слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде косички	равномерное помутнение с осадком
подвижность	неподвижен	подвижен в молодой 6-20 ч культуре, выращенной при 20-22 °С	

мазки из культур	короткие, прямые или слегка изогнутые палочки, при хроническом течении болезни - нити	короткие, прямые, овоидные палочки, иногда почти кокки, располагающиеся поодиночке или кучками	биполярность почти всегда отсутствует
проба на каталазу	отрицательная	положительная	-

Метод выявления бактерий кокковой группы

Сущность метода

Метод заключается в выявлении бактерий кокковой группы (стафилококков, стрептококков), в определении морфологии, характера роста на питательных средах и способности отдельных стафилококков коагулировать цитратную плазму крови кролика под воздействием фермента коагулазы.

Проведение испытания

Микроскопия – грамположительные, неспорообразующие, круглые клетки, располагающиеся одиночно, цепочками, гроздьями и в виде ланцетовидных диплококков.

На мясопептонном бульоне (стафилококки и диплококки) – равномерное помутнение с выпадением обильного осадка.

На мясопептонном бульоне (стрептококки) – бульон прозрачный, на дне пробирки – осадок.

На мясопептонном агаре (стафилококки, диплококки и стрептококки) – мелкие, прозрачные или мутноватые колонии.

Патогенность стафилококков определяют реакцией коагуляции.

Постановка реакции плазмокоагуляции

Сухую кроличью плазму разводят согласно Наставления и разливают по 0,5 мл в две стерильные пробирки. В одну пробирку петлей вносят суточную агаровую культуру испытуемого стафилококка, другая пробирка является контрольной. Внесенную культуру тщательно перемешивают, после чего обе пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С. Результаты реакции учитывают через 2-4 часа и через 24 часа. Штаммы стафилококка, продуцирующие фермент плазмокоагулазу, вызывают свертывание плазмы, вследствие чего она превращается в студнеобразную массу, не выливающуюся при перевертывании пробирки.

Обработка результатов

При получении положительной реакции плазмокоагуляции считается, что в мясе обнаружен патогенный стафилококк.

Метод выявления бактерий рода сальмонелл

Сущность метода

Метод выявления сальмонелл заключается в определении их характерного роста на элективных средах и установлении ферментативных и серологических свойств.

Проведение испытания

Выявление сальмонелл проводится в четыре последовательных этапа: первичный (прямой) посев, обогащение, посев со среды обогащения и подтверждение.

Первичный посев производится путем посева взвеси исследуемого материала на плотные элективные среды.

На элективных средах сальмонеллы растут, образуя характерные колонии:
- на фуксин-сульфитном агаре (агаре Эндо) – круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные или полупрозрачные колонии;
- на эозин-метиленовом синем агаре (агаре Левина) – прозрачные, бледные, нежно-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

Обогащение проводится путем посева на жидкие селективные среды. Пересев после обогащения проводится на плотные селективные диагностические среды.

На селективных средах сальмонеллы растут:

- на бактоагаре Плоскирева в виде бесцветных колоний;
- на висмут-сульфитном агаре – в виде черных или коричневых колоний с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

Микроскопия – грамтрицательные палочки с закругленными концами, неспорообразующие.

Подтверждение наличия бактерий из рода сальмонелл проводят путем определения соответствующих биохимических и серологических свойств колоний.

Обработка результатов

Обнаружение подвижных (кроме *S. pullorum* и *S. gallinarum*) палочек, отрицательных по Граму, не ферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и манит с образованием кислоты и газа (*S. typhi* *suís* не ферментирует манит), дающих положительную реакцию агглютинацию с монорецепторными O – и H-сальмонеллезными сыворотками, указывает на присутствие в мясе бактерий из рода сальмонелл.

Метод выявления бактерий из рода кишечной палочки – Эшерихий

Сущность метода

Метод заключается в определении морфологии, характера роста на элективных средах с лактозой и отсутствия способности образовывать цитохромоксидазу, утилизировать цитрат, образовывать сероводород и способности продуцировать индол.

Проведение испытания

Микроскопия – мелкие палочки с закругленными концами, грамотрицательные.

На агаре Эндо – красные с металлическим блеском (или без него), розовые с красным центром колонии.

На эозин-метиленовом синем агаре (агаре Левина) – темно-фиолетовые блестящие колонии.

На бактоагаре Плоскирева – кирпично-красные с глянцевой поверхностью колонии.

При наличии колоний, характерных для бактерий кишечной палочки – Эшерихий. их дифференцируют от других сходных микроорганизмов по биохимическим свойствам.

Обработка результатов

Обнаружение грамотрицательных палочек, образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, ферментирующих лактозу, образующих индол, не разлагающих мочевины, не ассимилирующих цитраты, не образующих сероводород, указывает на наличие бактерий кишечной палочки – Эшерихий.

Метод выявления бактерий из рода протей

Сущность метода

Метод заключается в определении морфологии, роста на питательных средах и способности гидролизовать мочевины, образовывать сероводород и не ферментировать манит.

Проведение испытания

Микроскопия – грамотрицательные, полиморфные палочки.

На МПА (скошенном) – вуалеобразный, расплывающийся по поверхности среды налет (рост) – Н – форма.

На агаре Плоскирева – прозрачные колонии, обладающие характерным запахом, вокруг колоний желтый цвет – О - форма.

При наличии колоний, характерных для бактерий протей, определяют биохимические свойства.

Обработка результатов

Обнаружение полиморфных грамотрицательных палочек, образующих характерный рост на средах Н-форма, подвижных (О – форма – неподвижные), ферментирующих глюкозу и мочевины, не ферментирующих лактозу и манит, указывает на наличие бактерий из рода протей.

Метод выявления анаэробов

Сущность метода

Метод заключается в определении их способности расти в отсутствие кислорода воздуха, морфологии возбудителей, роста на питательных средах и на выявлении патогенности возбудителей путем заражения лабораторных животных.

Проведение испытания

Микроскопия – грамположительные микроорганизмы (возбудитель некробактериоза – грамотрицательный), со спорами или без спор.

На среде Китта-Тарроцци – помутнение и газообразование.

В случае необходимости изучают культуральные и биохимические свойства выделенной чистой культуры.

Для биологической пробы используют исходный материал, а также культуру.

Обработка результатов

Обнаружение грамположительных палочек со спорами или без спор, образующих характерный рост на питательных средах, вызывающих гибель лабораторных животных, указывает на наличие возбудителей анаэробных инфекций.

Контрольные вопросы:

1. Что не относится к случаям вынужденного убоя?
2. В какой последовательности проводится реакция плазмокоагуляции?
3. При исключении каких возбудителей проводится постановка биологической пробы?
4. Для обнаружения каких бактерий применяется агар Эндо?
5. С какой целью проводится окрашивание бактериологических мазков методом Ребигера?

6. Рекомендуемая литература:

1. **ГОСТ 21237-75.** Мясо. Методы бактериологического анализа.
2. **ГОСТ 26503-85.** Животные сельскохозяйственные. методы лабораторной диагностике клостридиозов.
3. **Методические указания** по лабораторной диагностике пастереллезов животных и птиц. ГУВ МСХ СССР №22-7/82 20.08.92 г.
4. **Методические указания** по лабораторной диагностике рожи (эризепилоида) свиней. Департамент ветеринарии МСХ РФ №13-5-2/0005 26.01.01 г.
5. Лабораторная диагностика листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики (инструктивные документы). ГУВ Госагропрома СССР, МЗ СССР 13.02.87 г.