



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
БАШКИРСКАЯ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ

УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ

Лабораторно-практическое занятие. **Световая микроскопия.**
Приготовление и окраска мазков различными методами

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Специальность: Ветеринария

Курсы повышения квалификации по теме: **«Лабораторная диагностика инфекционных и инвазионных болезней животных, птиц, пчел и рыб».**

Категория слушателей: ветеринарные специалисты ветлабораторий.

УДК 619:614

ББК

Рекомендованы к изданию Учебно-методическим советом Учебного центра ДПО ГБУ Башкирская НПВЛ (протокол № 1 от «3» марта 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.

**СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ.
ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ОКРАСКА МАЗКОВ РАЗЛИЧНЫМИ
МЕТОДАМИ**

Цель занятия: изучить правила работы с микроскопом, овладеть способами окраски мазков.

Категория слушателей курсов: ветеринарные специалисты ветлабораторий.

Слушатели курсов должны знать:

1. Устройство микроскопа и правила работы с ним.
2. Методы приготовления мазков.
3. Методы окрашивания мазков.

Слушатели курсов должны уметь работать с микроскопом, самостоятельно готовить 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: микроскоп, мазки-отпечатки, мазки из культур.

Оборудование, приборы: микроскоп.

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

При помощи микроскопа определяют форму, взаимное расположение, тип строения клеточной стенки и ряд других признаков бактериальной клетки, без выяснения которых невозможна идентификация микроорганизма.

В характеристику микроскопа включают два таких показателя, как увеличение и разрешающую способность. Увеличение – способность давать увеличенное изображение исследуемого объекта. Разрешение – четкость получаемого изображения.

УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА

Микроскоп состоит из механической и оптической частей.

Механическая часть:

- а) микрометрический винт;
- б) макрометрический винт;
- в) клеммы для установки препарата

Оптическая часть:

- а) объективы;
- б) окуляры;
- в) осветительное устройство

ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОКОПОМ

Оптика микроскопа должна быть чистой. Для этого микроскоп закрывают чехлом. Оптику протирают снаружи мягкой тряпочкой, не оставляющей волокон и нитей. Никогда не надо разбирать объектив, так как нарушается расстояние между линзами. Пыль с задней линзы объектива выдувают грушей или снимают кисточкой. Не следует использовать смеси

иммерсионных масел, поскольку из-за различий в показателе преломления неизбежно будет появляться искажение изображения.

Последовательность операций при приведении микроскопа в рабочее положение

1. В рабочее положение ставят объектив x10, конденсор поднимают, диафрагму конденсора открывают полностью, включают свет.
2. На предметный столик помещают предметное стекло с объективом, фокусируют объектив на объекте и добиваются достаточно хорошего изображения.
3. Поворотом револьвера устанавливают необходимый объектив. Если это иммерсионный объектив, то на стекло наносят каплю иммерсионного масла. Объектив опускают осторожно, сначала при помощи микровинта до соприкосновения с маслом, затем проводят фокусировку, глядя в окуляр. После того как появилось изображение, настраивают освещение.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОКРАШЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИЙ (МАЗКОВ)

Сущность метода

Приготовление окрашенных препаратов складывается из нанесения исследуемого материала на предметное стекло, высушивания на воздухе, фиксации и собственно окрашивания.

Предметные стекла должны быть чистыми и обезжиренными.

Приготовление мазков из жидкого материала (бульонная культура, ликвор, моча и т. д.). Материал бактериологической петлей наносят на предметное стекло и круговыми движениями петли равномерно распределяют на площади 1-1,5 см².

Приготовление мазков из органов и тканей. Поверхность органа прижигают, стерильными ножницами вырезают кусочек ткани, захватывают пинцетом, поверхностью среза несколько раз прикладывают к поверхности стекла, получая мазки-отпечатки.

Приготовление мазка из культур на плотных питательных средах. На предметное стекло наносят каплю стерильной воды, в нее вносят бактериологической петлей небольшое количество бактериальной массы и

суспендируют, пока жидкость не станет слегка мутноватой. Петлю прожигают для удаления избытка бактерий.

Приготовление мазка из мокроты или гноя. Материал помещают на одном из концов предметного стекла, накладывают на него второе стекло, слегка прижимают и сдвигают стекла в противоположных направлениях. На стеклах получают мазки с тонко, равномерно распределенным материалом.

Приготовление мазка из крови. Каплю крови наносят на один из концов предметного стекла, ближе к краю. Шлифованное стекло под углом 45° подводят к капле, чтобы кровь растеклась по его краю, и затем равномерно распределяют справа налево по всей поверхности стекла. Чем острее угол, под которым находится шлифованное стекло, тем тоньше мазок.

МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ МАЗКОВ

Тепловая фиксация. Предметное стекло с нанесенным материалом проводят трижды над пламенем горелки, держа мазков вверх. Время фиксации не должно превышать 5-6 секунд.

Химическая фиксация. Требуется больше времени, но дает более достоверные данные по морфологии клетки. Известно много способов химической фиксации с использованием этилового 95° спирта, спирт-эфира, метилового спирта, ацетона и т. д.

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

Простое окрашивание. При этом применяют только одну краску. Простой метод окрашивания позволяет в основном определить у бактерий форму, размер и взаимное расположение клеток.

Часто для окрашивания данным методом применяют кристаллический фиолетовый, метиленовый синий по Леффлеру, фуксин Пфейффера. Раствором метиленового синего окрашивание проводят в течение 3-5 минут, водно-спиртовым раствором фуксина в течение 1-2 минут, раствором кристаллического фиолетового в течение 0,5-1 минуты. После окраски препараты промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Сложные методы окраски бактерий. При этом применяют несколько красок, одна из которых является основной (главной), а другая дополнительной (контраст). После воздействия первой краской мазок обесцвечивают и только после этого подвергают дополнительной окраске. Сложные методы окраски имеют важное дифференциально-диагностическое значение для характеристики изучаемого микроба.

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.

Окраска капсул методом Романовского – Гимза

Фиксированный в этаноле или жидкости Никифорова мазок помещают в краску Романовского-Гимза (15-20 капель краски на 10 мл дистиллированной воды) на 15-20 мин. Промывают, высушивают.

Обработка результатов

Тело бактерий окрашивается в темно-синий цвет, капсулы – розовый.

Контрольные вопросы:

1. Что определяют при помощи микроскопа?
2. Что относится к оптической части микроскопа?
3. В чем состоит сущность приготовления окрашенных препаратов?
4. Как проводится тепловая фиксация мазков?
5. В чем состоит сущность сложных методов окрашивания мазков?

Рекомендуемая литература:

1. **Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных.** Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С.: - М.: ИзографЪ, 2005.