

**Бунина
Татьяна Сергеевна**



**Рабочая тетрадь
по микробиологии**

Учебное пособие

**«Микробиология»
Рабочая тетрадь**

*Разработала
Бунина Татьяна Сергеевна
специалист Управления ветеринарии
по Тамбовской области*

УДК: 579
ББК: 28.4
Б91

Бунина Т.С.

Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы микробиологии». Учебное пособие предназначено для студентов учреждений СПО. – Тамбов: АО Издательский дом «Мичуринск», 2019. – 82 стр.

Рабочая тетрадь разработана в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта по специальности 36.02.01 Ветеринария, в рамках укрупненной группы специальностей 36.00.00 Ветеринария и зоотехния.

Рабочая тетрадь «Микробиология» включает в себя задания к лабораторно-практическим работам по основным разделам учебной дисциплины «Основы микробиологии».

В структуре каждого задания имеются методические указания к выполнению лабораторно-практических работ и контрольные вопросы для проверки теоретической подготовленности студентов к занятию.

Рецензенты:

А.И. Филин – начальник Управления ветеринарии Тамбовской области;

Н.В. Кочеткова – начальник ТОГБУ «Кирсановская районная станция по борьбе с болезнями животных»

УДК: 579
ББК: 28.4

© Бунина Т.С.
© Оформление АО «Издательский дом «Мичуринск», 2019

Содержание

Введение	4
Техника безопасности.	5
1. ПЗ №1 Микробиологическая лаборатория и её устройство	6
2. ПЗ №2 Культивирование бактерий и изучение культуральных свойств . . .	19
3. ПЗ №3 Приготовление простых и сложных питательных сред	31
4. ПЗ № 4 Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам	38
5. ПЗ №5 Взятие и пересылка патматериала для бактериологических исследований	50
6. ПЗ №7 Реакция иммунодиффузии (РИД) для диагностики лейкоза КРС	72
Литература	82

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – одна из основных дисциплин биологии, поскольку без знания особенностей микроорганизмов нельзя понять всего многообразия жизни на Земле, условий ее появления и эволюции. Огромное значение имеет исследование микроорганизмов для развития таких наук, как биохимия, молекулярная биология, генетика, биофизика, экология и ряд других.

Возникновение и развитие биотехнологии, приобретающей все большее значение в сельском хозяйстве, базируется на использовании микроорганизмов как продуцентов множества полезных веществ, таких как: кормового белка, ферментов, антибиотиков, гормонов, аминокислот, витаминов. На использовании микроорганизмов основаны методы генетической инженерии.

Важное значение имеет разработка рационального способа использования биохимической активности микроорганизмов для повышения плодородия почв, добычи полезных ископаемых, утилизации промышленных отходов, восполнения энергетических ресурсов, очистки окружающей среды.

Вместе с тем, необходимо изыскивать новые способы борьбы с микроорганизмами, вызывающими заболевания человека, животных и растений, а также порчу промышленных изделий и продуктов.

Быстрое накопление знаний в разных областях микробиологии способствует развитию научно-технического прогресса. Но чем больше открытий совершают ученые, тем больше новых вопросов возникает перед ними.

Техника безопасности

Студенты, работающие с культурами микроорганизмов, должны строго соблюдать следующие правила:

- в помещении практикума можно находиться только в спецодежде (наглухо застегнутом халате, шапочке или косынке);
- нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания и их употреблять;
- книги, сумки, пакеты надо держать на отведенном для этого столе;
- при себе иметь цветные карандаши для зарисовки морфологических признаков бактерий и грибов;
- перед началом работы обязательно следует проверить наличие и исправность приборов, посуды, газовых или спиртовых горелок, реактивов. О замеченных недостатках и неисправностях сообщить преподавателю;
- приступать к работе можно только с разрешения преподавателя и всю работу проводить в строгом соответствии с изучаемой методикой;
- соблюдать опрятность в работе, содержать в чистоте рабочее место и оборудование;
- при работе с культурами или другим инфицированным материалом, придерживаться общепринятых в бактериологической практике технических приемов, исключающих возможность заражения;
- если в процессе работы культура микроорганизмов или другой материал случайно попали на стол, на это место накладывают тампон, смоченный дезинфицирующим раствором на 1 час, и рядом оставляют записку о времени данной аварии;
- при попадании культуры или зараженного материала на кожу, конъюнктиву или в рот, принимают экстренные меры к обеззараживанию;
- в конце занятия культуры и другой материал дежурный относит в лабораторию, рабочее место приводится в порядок;
- перед уходом из лаборатории необходимо снять халат, тщательно вымыть руки;
- выполнение правил работы и техники безопасности на учебных занятиях по микробиологии контролируют преподаватель и дежурный студент.

Занятие 1

Тема: «Микробиологическая лаборатория и её устройство. Морфология микроорганизмов»

Цель: ознакомить студентов с принципами микробиологической лабораторной диагностики инфекционных заболеваний; изучить микроскопический метод исследования.

Время – 90 минут

Задачи:

Студент должен знать:

- технику безопасности при работе;
- формы микроорганизмов;
- методы окраски микроорганизмов;
- принципы работы микробиологической лаборатории.

Студент должен уметь:

- приготовить микроскопический препарат;
- окрашивать простым и сложным способом по методу Грама;
- микроскопировать и определять морфологию микроорганизмов.

Вопросы для обсуждения:

- Что изучает наука микробиология, каковы её задачи?
- Какой вклад в науку внесли А. Левенгук, Л. Пастер, Д. Листер, Р. Кох, И.И. Мечников, Д.И. Ивановский?
- Как классифицируются микроорганизмы? Как даются названия микроорганизмам?
- Каковы основные группы микроорганизмов?
- На каких принципах основана классификация микроорганизмов?
- На какие группы по форме делятся бактерии?
- Какую форму имеют кокки?
- Какую форму имеют стафилококки?
- Какую форму имеют стрептококки ?
- Как располагаются диплококки?
- Как располагаются тетракокки?
- Как располагаются сарцины?
- Чем отличаются бактерии от бацилл?
- Какие виды бактерий подвижны?
- На какие формы делятся извитые формы бактерий?
- Какие микроорганизмы имеют форму запятой?

Правила поведения и техника безопасности при работе в бак. лаборатории:

- Входить в лабораторию только в спецодежде и сменной обуви;
- Запрещается выпускать из-под спецодежды рукава, воротнички, волосы;
- Нельзя класть на столы пакеты, сумки и пр.
- Нельзя в лаборатории принимать пищу, жевать жевательную резинку;
- Необходимо внимательно слушать и наблюдать демонстрацию опыта преподавателем;
- Соблюдать осторожность при работе с культурой бактерий;
- Прежде чем зажечь спиртовку, необходимо приподнять фитиль и выпустить накопившиеся пары спирта;
- Тушить огонь спиртовки допустимо только колпачком от спиртовки;
- Необходимо аккуратно обращаться со стеклянными предметами;
- После работы следует убирать рабочее место и дезинфицировать поверхность стола;
- После работы необходимо мыть руки с мылом, при необходимости - дезинфицировать.

Самостоятельная работа:

1. Приготовление мазков;
2. Высушивание;
3. Фиксация;
4. Окраска мазков;
5. Микроскопия мазков;
6. Исследование результатов.

Методические указания к работе

Задание 1. Приготовление микропрепаратов

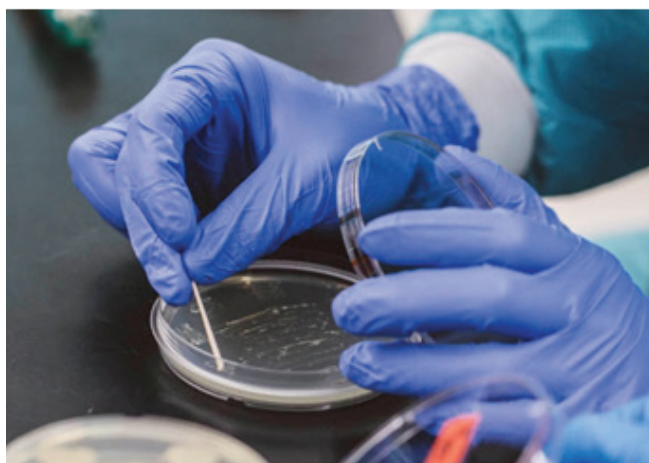
а) Приготовление мазка-отпечатка

- Необходимо стерильно сделать горизонтальный срез органа;
- На свежий срез быстро и аккуратно, без приложения усилий, накладывается стерильное обезжиренное предметное стекло;
- И быстро поднимается вертикально вверх, без смещения в какую-либо сторону;
- Высушите препарат на воздухе. Для ускорения высушивания, предметное стекло с мазком, обращенным кверху, подержите в струе теплого воздуха, высоко над пламенем спиртовки, не внося препарат в пламя;
- Препарат фиксируется в жидком фиксаторе, промывается осторожно проточной водой, высушивается, окрашивается и микроскопируется.

б) Приготовление мазка из колоний культуры E. Coli

- На предметное стекло нанесите пипеткой каплю физраствора;

- Зажгите спиртовку, соблюдая правила техники безопасности;
- Простерилизуйте петлю, внося ее в пламень горелки в вертикальном положении. После того как петля накалится, проведите конец петледержателя через пламя. Необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней части пламени;
- В правую руку возьмите петлю, а левой откройте чашку Петри с выращенной культурой бактерий;
- Снимите часть колонии микробов и закройте чашку Петри;
- Перенесите микроорганизмы в каплю физраствора и размешайте, равномерно распределяя по стеклу (в виде небольшого круга);
- Простерилизуйте петлю над пламенем и поставьте в штатив;
- Высушите мазок на воздухе.



Задание 2. Фиксация мазков

1. Возьмите предметное стекло за края, мазок обращайтесь кверху;
2. Медленно проведите 3-4 раза через наиболее горячую часть пламени. Не следует перегревать мазок, т.к. при этом происходят изменения структуры клеток, их внешнего вида;
3. Фиксация убивает микробы и делает безопасной работу с ними, обеспечивая прилипание клеток к стеклу, улучшает окрашивание;
4. С обратной стороны стекла карандашом запишите номер препарата.



Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 3. Окрашивание мазков

- а) Простой способ окрашивания
- Фиксированный мазок из полости рта поместите на параллельные стеклянные палочки, лежащие над лотком;
 - Нанесите раствор красителя – метиленового синего, и выдержите в нем в течение 1-3 минут;
 - По окончании окраски препарат промойте водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной;
 - Просушите препарат фильтровальной бумагой, осторожно промокая. При такой окраске дифференцируется ядро и протоплазма.

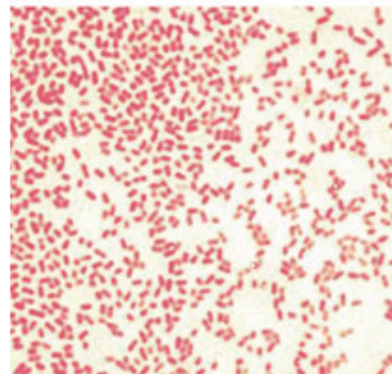
б) Окрашивание сложным методом по Граму

- На фиксированный мазок из культуры бактерий положите сухую полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором генцианвиолета. Нанесите на бумагу 2-3 капли воды. Окрашивайте 2 минуты;
- Снимите бумагу пинцетом и промойте препарат водой;
- Обработайте раствором Люголя в течение 1 минуты. Слейте раствор в лоток;
- Нанесите на мазок несколько капель спирта для обесцвечивания. Выдержать в течение 30 секунд;
- Быстро промойте препарат водой;
- Нанесите 1-2 капли раствора фуксина на 2 минуты;
- Промойте мазок до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной;
- Просушите аккуратно препарат фильтровальной бумагой.

При таком методе окрашивания одни бактерии, имеющие тонкую оболочку, обесцвечиваются спиртом и докрасиваются фуксином в красный цвет - это грамотрицательные микроорганизмы. Другие, имеющие толстую оболочку, хорошо окрашиваются генцианвиолетом и не обесцвечиваются спиртом, оставаясь фиолетовыми – они грамположительные.

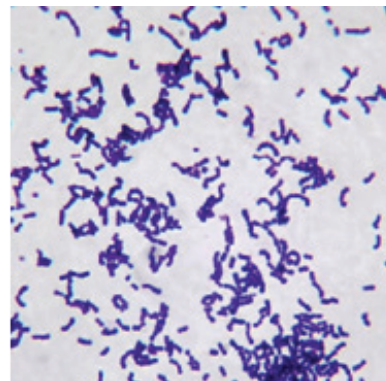
К грамотрицательным бактериям относятся:

*менингококки, гонококки,
кишечная палочка и др.*



К грамположительным относятся:

*стафилококки, стрептококки, пневмококки,
бактерии сибирской язвы,
столбняка, ботулизма.*



Выполнение работы

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Задание 4. Микроскопическое исследование препаратов

Для микроскопических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный и другие) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный, темнопольный и др.).

Окрашенный препарат микроскопируют с иммерсионным объективом (ОН x 90), окуляром (ОК x 15), получая увеличение в 1350 раз (или ОН x 9 и ОК x 7 – увеличение в 650 раз).

- Подготовить микроскоп к работе: отрегулировать освещение, поднять конденсор до упора, открыть диафрагму, установить плоское зеркало;
- На окрашенный мазок нанести небольшую каплю иммерсионного масла, поместите мазок на предметный столик и осторожно опустите объектив ОН x 90 до соприкосновения с маслом. Наблюдая в окуляр с помощью макровинта, проведите грубую фокусировку. Окончательную фокусировку произведите, используя микровинт, вращение которого допускается в пределах одного оборота. Правой рукой осторожно вращайте микровинт, левой – передвигайте препарат;
- Рассмотрите микроорганизмы, определите их форму и отношение бактерий к окраске по Граму;
- Зарисуйте препарат цветными карандашами, условно обозначив после зрения в виде круга;
- Сделайте заключение по проведенному исследованию.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 5

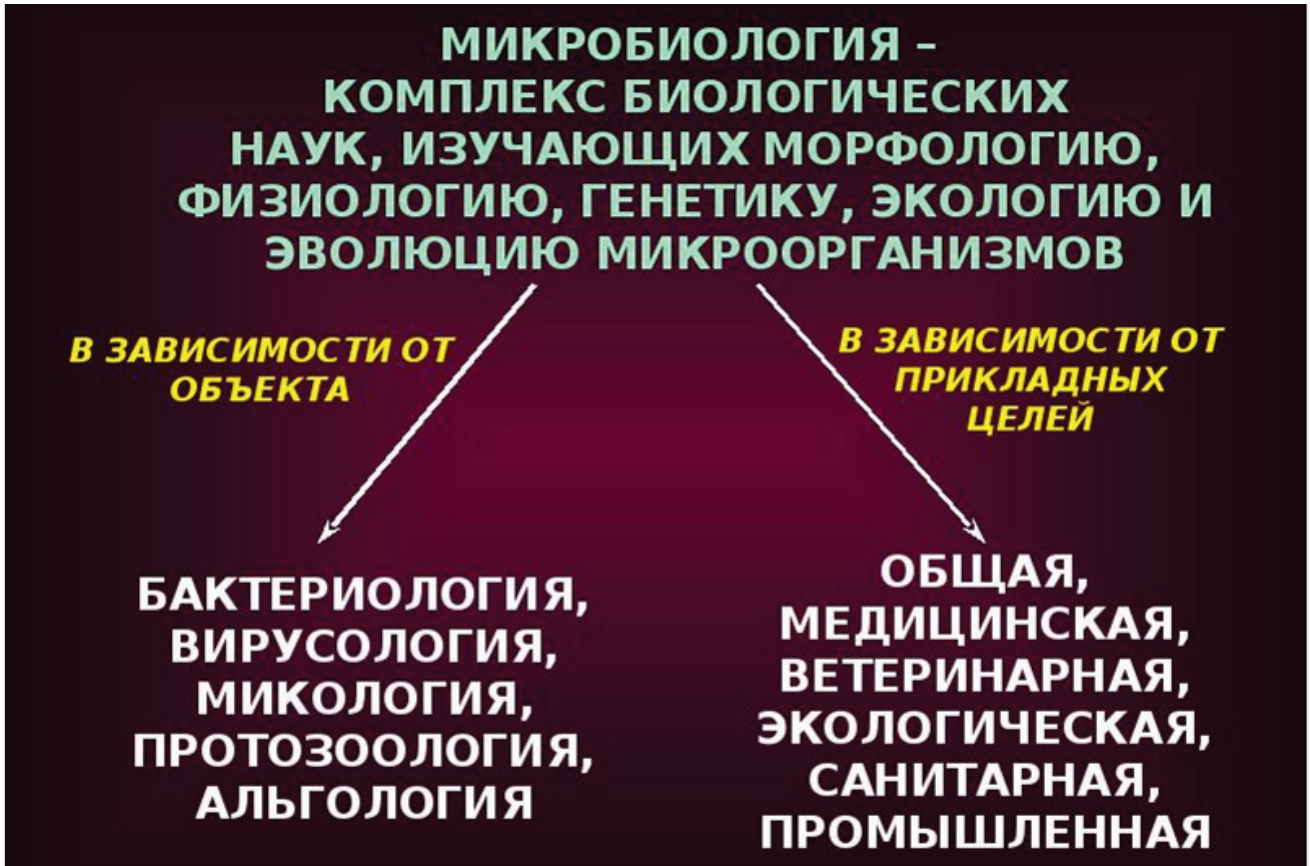
По окончании работы проведите уборку рабочего места:

- Приведите в порядок микроскоп. Приподнимите тубус, снимите препарат, вытрите масло с объектива чистой салфеткой, опустите конденсор, переведите револьвер в нейтральное положение и опустите тубус до упора. Накройте микроскоп колпачком;
- Вылейте воду из лотка для промывания препаратов;
- Наведите общий порядок на столе;
- Сделайте заключительную дезинфекцию рабочего стола (протрите стол дезинфицирующим раствором);
- Вымойте руки с мылом, при необходимости продезинфицируйте.

Вопросы для закрепления

1. Бактериология, вирусология, микология
2. Протозоология, гельминтология, иммунология, арахноэнтомология
3. Этиология
4. Диагностика
5. Патогенные микроорганизмы
6. Профилактика
7. Стафилококки (форма)
8. Стрептококки (форма)
9. Вибрион (форма, пример)
10. Спириллы (форма)
11. Спирохеты (форма, примеры)
12. Клеточная стенка (строение, функция)
13. Цитоплазматическая мембрана
14. Нуклеоид (что это и его функции)
15. Капсула (что это, когда образуется)
16. Споры у бактерий (функции)
17. Споры у грибов (функции)
18. Микрометр
19. Нанометр

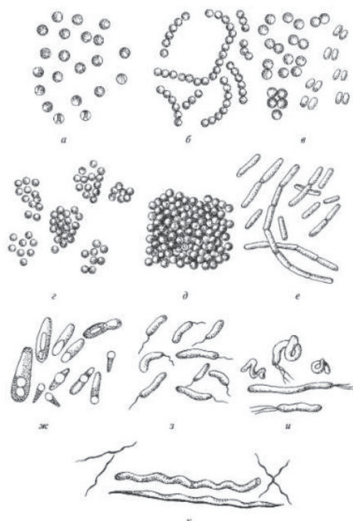
Студент _____ Преподаватель _____



ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

- э ← I Эвристический – Гиппократ, Иби Сина (Авиценна)
- т ← II Морфологический – А. Левенгук, Р. Кох, И. Мечников, Д. Ивановский
- а ← III Физиологический – Л. Пастер, Н. Гамался
- п ← IV Иммунологический – И. Мечников, П. Эрлих, А. Флеминг
- ы ← V Молекулярно-генетический (40-50 гг. XX века) – расцвет молекулярной биологии, расшифрованы и синтезированы отдельные гены

Форма и строение клеток



Шаровидные:
а – микрококки;
б – стрептококки;
в – диплококки;
г – стафилококки;
д – сарцины;
палочковидные:
е – бактерии (палочки);
ж – бациллы;
извитые:
з - вибрионы,
и – спириллы;
ж – спирохеты.

Размеры клеток шаровидных бактерий составляют 0,2-2,5 мкм. Длина палочковидных и извитых бактерий от 1 до 5 мкм.

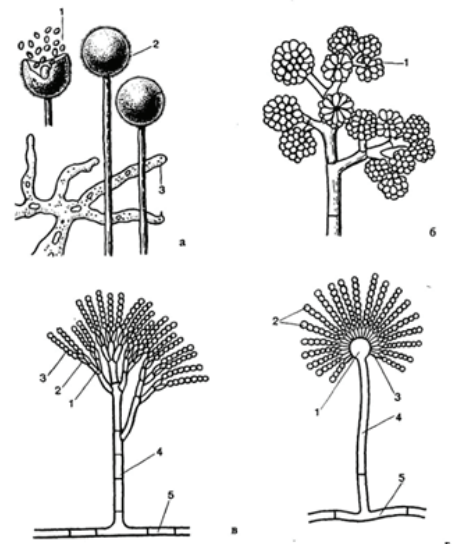
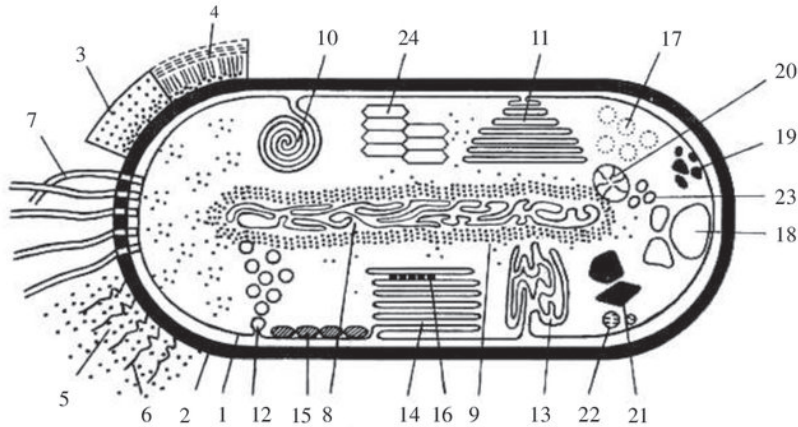


Рис. 41. Споры бесполого способа размножения:
а – Мико: 1 – споры; 2 – спорангии; 3 – мицелий; б – Botrytis: 1 – конидии; а – Penicillium: 1 – ветулы; 2 – стеригмы; 3 – конидии; 4 – конидиофор; 5 – вегетативная гифа; г – Aspergillus: 1 – булавовидное расширение конидиальной; 2 – конидии; 3 – стеригмы; 4 – конидиофор; 5 – вегетативная гифа.

Строение бактериальной клетки



Поверхностные (барьерные) структуры: 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – клеточная стенка; 3 – капсула; 4 – чехол; 5 – слизь; 6 – ворсинки; 7 – жгутики.

Генетический аппарат: 8 – нуклеоид.

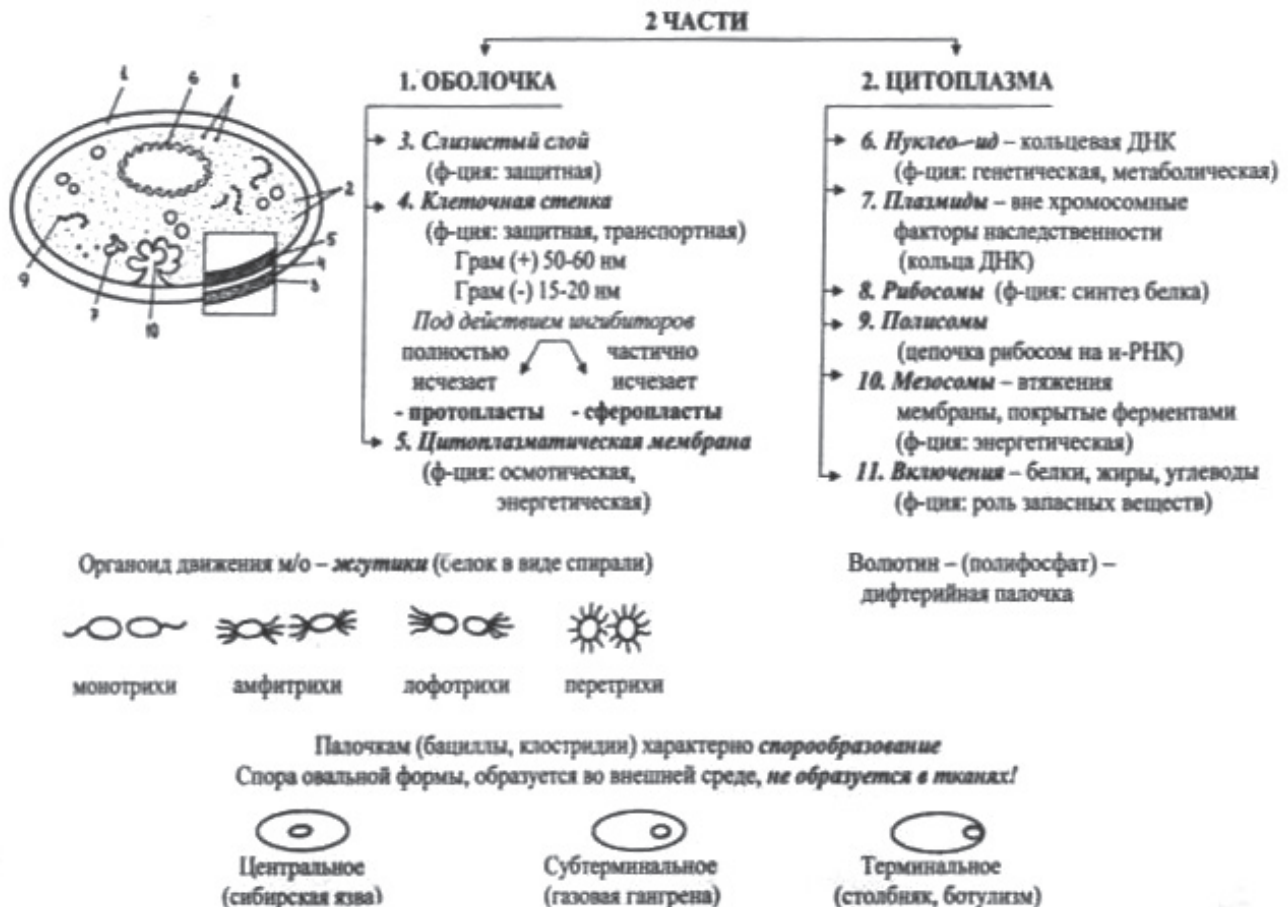
Белоксинтезирующий аппарат: 9 – рибосомы.

Метаболический аппарат: 10 – мезосома; 11 – ламеллярные структуры; 12 – хроматофоры (везикулярные тилакоиды); 13 – трубчатые тилакоиды; 14 – пластинчатые тилакоиды; 15 – хлоросомы; 16 – фикобилисомы.

Включения: 17 – полисахаридные гранулы; 18 – гранулы поли-β-оксимасляной кислоты; 19 – гранулы полифосфата; 20 – цианофитиновые гранулы; 21 – карбоксисомы; 22 – включения серы; 23 – углеводородные гранулы.

Прочие(приспособительные) структуры: 24 – газовые вакуоли.

III БЛОК ИНФОРМАЦИИ: СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ



Строение микроскопа



Занятие 2

Тема: «Культивирование бактерий и изучение культуральных свойств»

Цель: ознакомить студентов с принципами лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, микробиологическими методами исследований. Закрепить и углубить знания о физиологии бактерий.

Время – 90 минут

Задачи:

Студент должен *знать*:

- физиологические свойства бактерий;
- принципы культивирования бактерий;
- рост микроорганизмов на жидких и плотных питательных средах.

Студент должен *уметь*:

- производить посевы на жидкие и плотные питательные среды;
- выписать сопроводительную для исследования патогенного материала в бактериологическую лабораторию.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

- Каково значение химических элементов клетки?
- Как подразделяются микроорганизмы по типу питания?
- Каким путем проникают питательные вещества в клетку микроорганизмов?
- Из каких процессов состоит обмен веществ у микроорганизмов, в чем его смысл?
- Что такое ферменты, как они подразделяются и каково их значение для жизни микроорганизмов?
- В чем заключается дыхание у микроорганизмов? Как подразделяются микроорганизмы по типу дыхания? Приведите примеры.
- Что могут выделять микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности?
- Что такое рост и размножение микроорганизмов? Каковы виды размножения у микроорганизмов?
- Что такое культивирование микроорганизмов, и каковы условия культивирования?
- Каковы виды питательных сред и рост микроорганизмов на питательных средах?

Успех бактериологического исследования зависит от правильной и своевременной доставки исследуемого материала в бактериологическую лабораторию. Исследуемым материалом может быть:

- мокрота – при заболеваниях органов дыхания;
- каловые и рвотные массы – при желудочно-кишечных инфекциях;
- моча – при поражении почек и мочевыводящих путей;
- гнойное выделение - при гнойных очагах, кровь – при сепсисе и инфекционных заболеваниях.

К собранному для исследования материалу прилагают сопроводительную, в которой указывают:

- организацию, куда направляю материал;
- Ф. И. О. хозяина или организацию кому принадлежит животное;
- название исследуемого материала;
- цель исследования;
- клинический диагноз;
- дата взятия, время;
- подпись ветврача или ветфельдшера.

Методы лабораторной диагностики инфекционных и гнойно-септических заболеваний

Микроскопический – обнаружение возбудителя заболевания непосредственно во взятом патологическом материале при изучении мазка под микроскопом. Например, возбудителя гонореи, туберкулеза, трихомоноза, малярии, амебиаза, лейшманиоза, балантидиаза.

Бактериологический – это посев исследуемого материала на питательные среды, выделение чистой культуры возбудителя, определение его вида, типа, патологических свойств и чувствительности к лекарственным препаратам.

Вирусологический – это культивирование вирусов в культуре живой ткани.

Биологический – это выделение возбудителя и его токсина при заражении лабораторных животных.

Серологический – определение видов микроорганизмов с помощью иммунных реакций, выявление иммунных антител в сыворотке больного. Например, реакция Вассермана при сифилисе, реакция Видаля при брюшном тифе.

Аллергический – диагностика инфекционного заболевания с помощью кожно-аллергической пробы (реакция tbs при туберкулезе или маллеинизация при Сапе).

Самостоятельная работа:

- Посев мазков на жидкую и плотную питательную среду;
- Посев крови на гемакультуру (на стерильность);
- Изучение роста микроорганизмов на плотной и жидкой питательной среде;
- Выписка сопроводительной в бактериологическую лабораторию;
- Уборка и дезинфекция рабочего места.

Методические указания к работе

Задание 1. Посев мазков из ротовой и носовой полостей на питательную среду

а) Техника посева на жидкую питательную среду:

- зажечь спиртовку;
- взять пробирку с жидкой питательной средой в левую руку, а четвертым и пятым пальцем правой руки открыть пробирку;
- первым и вторым пальцами взять ватный тампон с исследуемым материалом и внести его в жидкую питательную среду;
- перемешать, внести тампон обратно в пробирку и над спиртовкой закрыть пробку пробирки;
- написать на пробирке номер пробы.

б) Техника посева на плотную среду:

- зажечь спиртовку;
- стерильной петлей взять небольшое количество исследуемого материала и нанести на поверхность среды у края чашки Петри;
- оторвать петлю от поверхности среды и начать втирать материал отдельными легкими движениями по поверхности питательной среды;
- остаток материала сжечь;
- написать номер пробы на чашке Петри, поставить посеvy микроорганизмов в термостат на 24 часа для выращивания.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

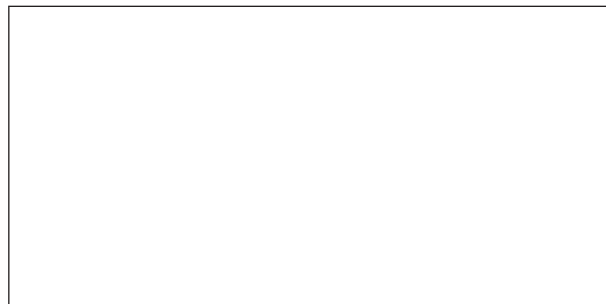
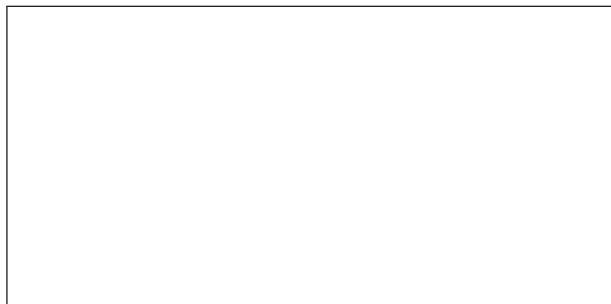
.....

.....

.....

Задание 2. Рассмотреть и зарисовать рост бактерий на жидкой и плотной питательной среде

Выполнение работы



МПБ

МПА

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 3. Посев крови на гемакультуру (стерильность)

1. приготовить спиртовку со спичками, питательную среду: 50 или 100 мл. желчного (или сахарного) бульона;
2. соблюдая правила асептики, взять кровь из яремной вены 5-10 мл, положить шприц с кровью на стерильный лоток;
3. быстро зажечь спиртовку;
4. открыть четвертым и пятым пальцами правой руки флакон с питательной средой возле спиртовки, взять шприц с кровью и внести ее в питательную среду;
5. закрыть флакон с пробиркой над спиртовкой, положить шприц для обработки в 5% раствор хлорамина, обработать лоток;
6. обвязать флакон, выписать направление в бактериологическую лабораторию для исследования;
7. отправить гемакультуру на исследование

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 4. Выписка сопроводительной в бактериологическую лабораторию для исследования взятого материала

Выполнить работу

В _____ ветеринарную лабораторию

Адрес: _____

При этом направляется для _____

Патологический материал для (перечислить, какой) _____

от _____, принадлежащ. _____
(вид и возраст животного)

_____ (название хозяйства, фермы, отделения, фамилия владельца животного)

Дата заболевания животного _____

Клиническая картина _____

Данные патологоанатомического вскрытия _____

Предположительный диагноз _____

Дата отправки материала _____

Взять задание у преподавателя и выполнить работу:

Задание 5

По окончании работы проведите уборку рабочих мест, сделайте заключительную дезинфекцию. Вымойте руки с мылом, а при необходимости обработайте их дезинфицирующим раствором.

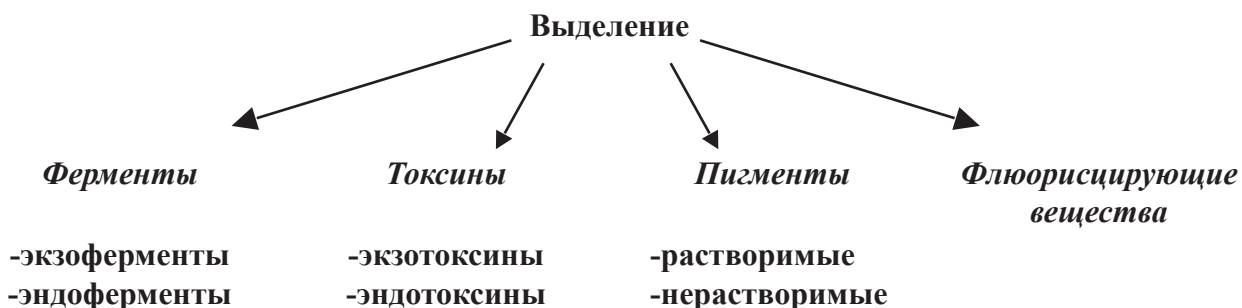
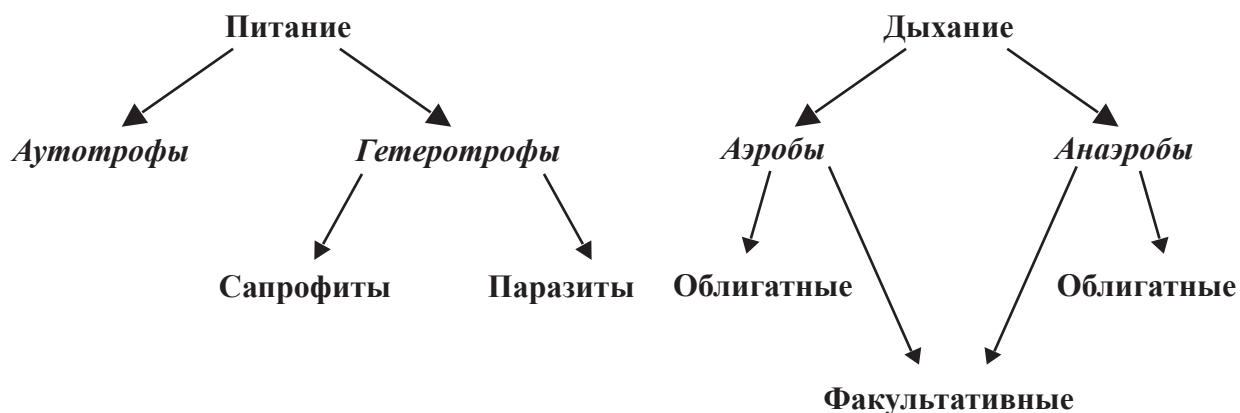
Вопросы для закрепления

1. Минеральные вещества – органогены (перечислить)
2. Микроэлементы (пример)
3. Органические вещества микроорганизмов (перечислить)
4. Аутотрофы
5. Гетеротрофы
6. Сапрофиты
7. Паразиты
8. Факультативные паразиты (пример)
9. Облигатные паразиты (пример)
10. Фототрофы
11. Хемотрофы
12. Эндоферменты (их характеристика)
13. Экзоферменты (их характеристика)
14. Конститутивные ферменты
15. Адаптивные ферменты
16. Дыхание у микроорганизмов
17. Брожение
18. Аэробы (примеры)
19. Анаэробы (примеры)
20. Облигатные анаэробы (примеры)

Студент _____ Преподаватель _____

Приложение к занятию №2

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



Рост М/О:

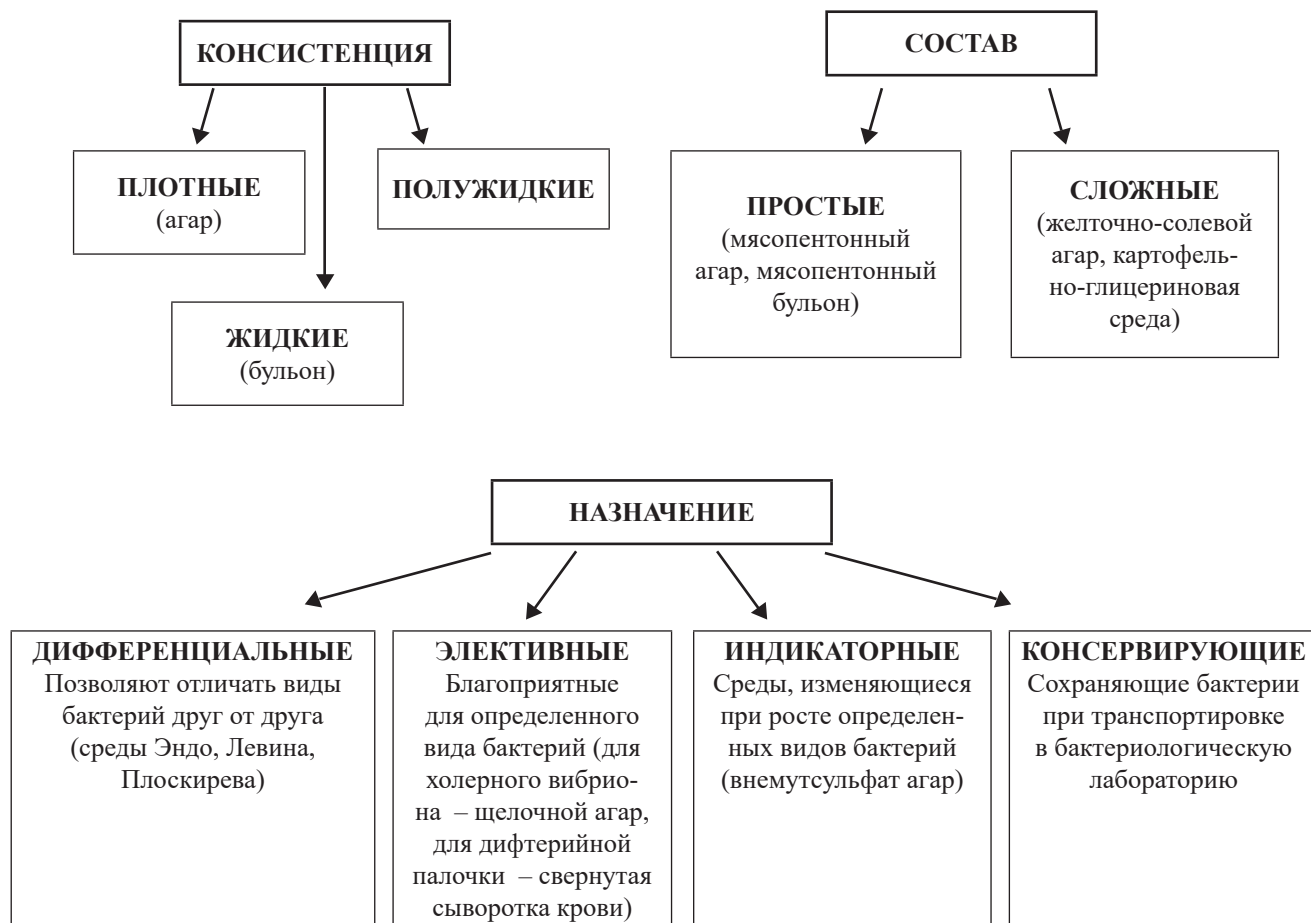
- в организме хозяина;
- на питательных средах.

Размножение М/О:

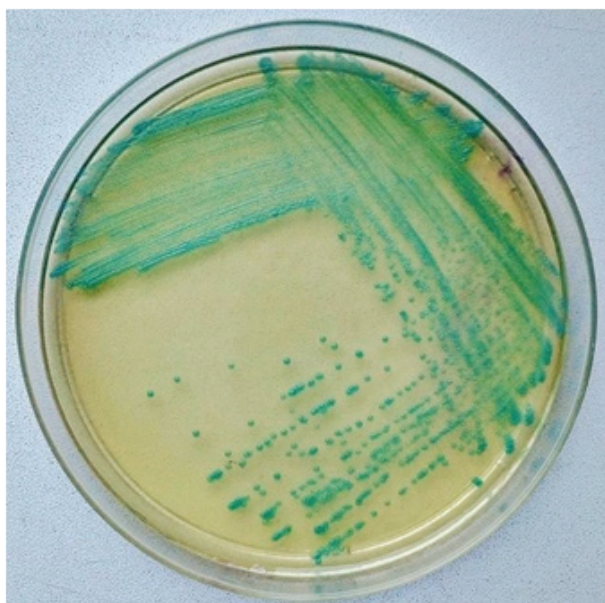
- простое (грам «+» и «-»);
- конъюгация;
- репродукция;

- спорами;
- почкованием.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ



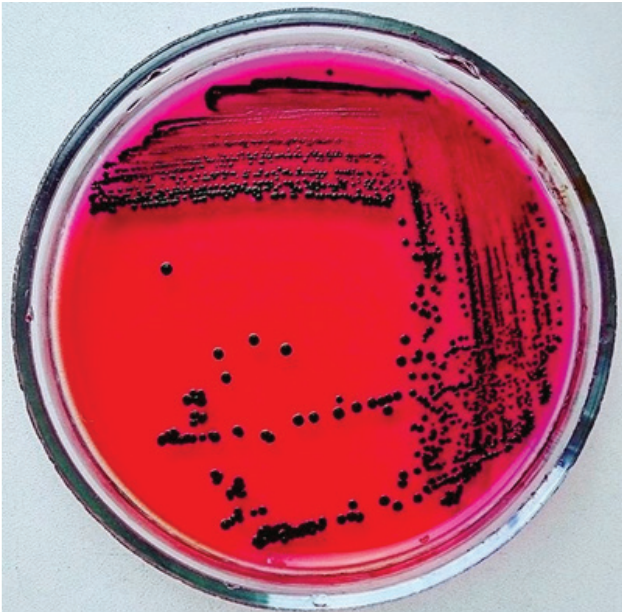
Рост бактерий на твердых питательных средах



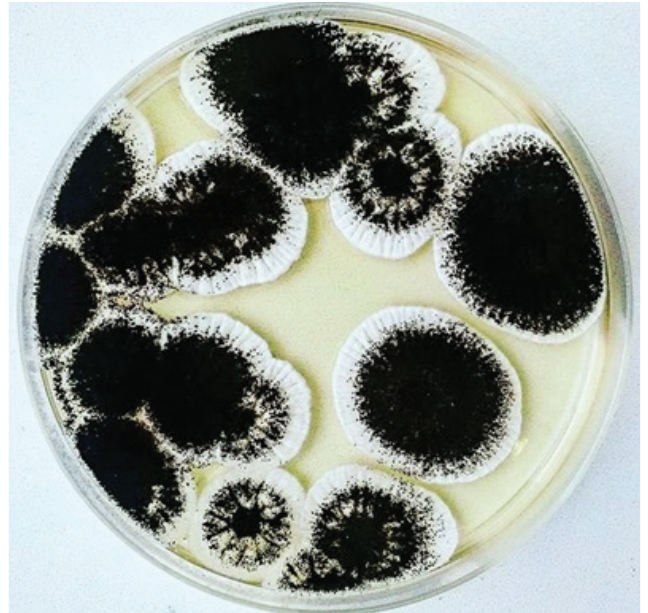
Listeria monocytogenes. Среда ALOA



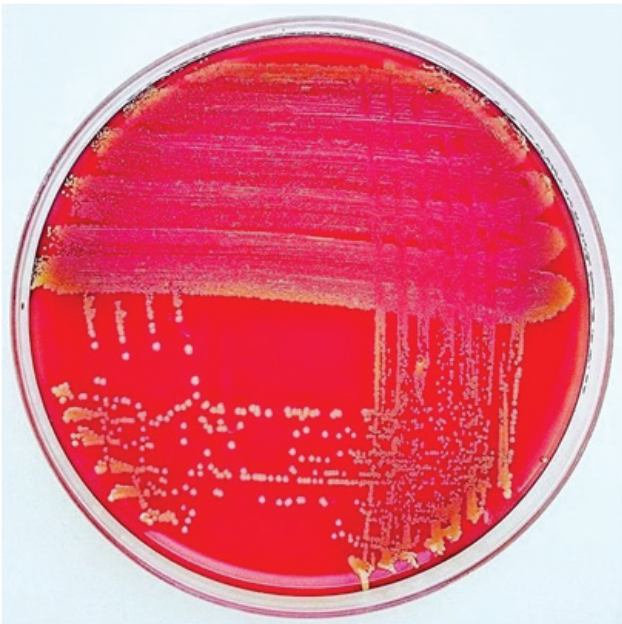
Escherichia coli. Агар Плоскирева



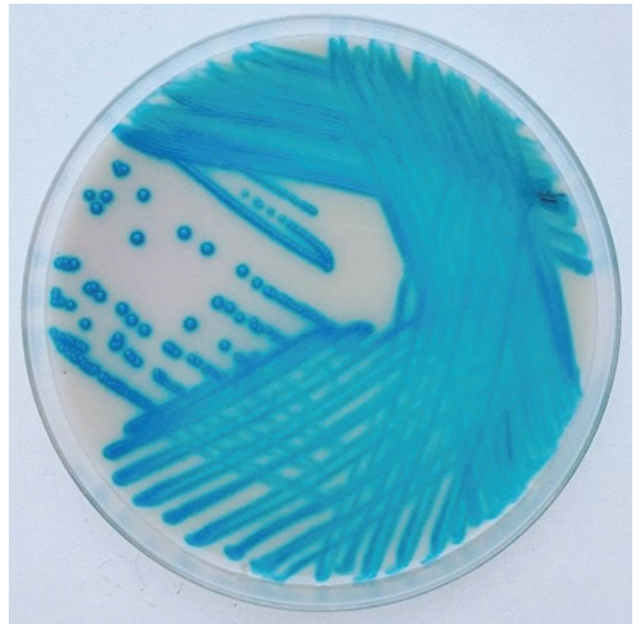
Salmonella Enteritidis.
Ксилозо-лизиновый
дезоксихолатный агар



Агар Сабуро.
Аспергиллы



Staphylococcus aureus.
Кровяной агар



Enterococcus faecalis
Хромогенный агар.

Занятие 3

Тема: «Приготовление простых и сложных питательных сред»

Цель: изучить методику приготовления простых питательных сред.

Время – 90 минут

Задачи:

Студент должен знать:

- принципы приготовления питательных сред;
- рост микроорганизмов на жидких и плотных питательных средах.

Студент должен уметь:

- производить плотные питательные среды;
- описывать рост бактерий на питательных средах.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

- Как классифицируют питательные среды по составу?
- Как классифицируют питательные среды по физическому состоянию?
- Как классифицируют питательные среды по назначению?
- Назовите источники углерода, используемые для культивирования микроорганизмов.
- Назовите источники азота, которые используют для приготовления питательных сред.
- Назовите источники серы, фосфора, микроэлементов, которые используют при приготовлении питательных сред.
- Что такое факторы роста?
- Назовите основные методы термической стерилизации. Какие объекты стерилизуют этими методами?
- Назовите основные методы холодной стерилизации и объекты, которые стерилизуют этими методами.

Методика приготовления питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Микролекция

Питание является важнейшей функцией микроорганизмов. Необходимые для питания вещества они получают из питательных сред, поэтому огромное значение имеет обеспечение микроорганизмов соответствующим питанием при культивировании их на искусственных питательных средах

В бактериологических лабораториях выращивают микроорганизмы на питательных средах в целях определения их наличия в патологическом материале, вида бактерий или грибов, их физиологических потребностей, чувствительности к антибактериальным веществам, физическим, химическим и биологическим воздействиям, для сохранения музейных культур и т.д.

Чтобы микроорганизмы хорошо развивались, к питательным средам предъявляют следующие требования:

1. Они должны содержать все необходимые питательные вещества: источники азота и углерода, неорганические соединения, микроэлементы, а также витамины, в основном группы В. В качестве универсального источника азота используют пептоны. Пептоны – это продукты гидролизного расщепления мяса или казеина. Универсальным источником для питательных сред являются углеводы, органические кислоты и многоатомные спирты.
2. Питательные среды должны иметь определенный рН. Так, для большинства микроорганизмов оптимум рН = 7,2 -7,4, а плесневые грибы, дрожжи, молочнокислые бактерии лучше развиваются при рН = 6,0.
3. Питательная среда должна быть стерильной, т.е. не содержать микроорганизмов.
4. Питательная среда должна быть прозрачной для того, чтобы можно было различить в ней рост микроорганизмов.
5. Питательная среда должна быть влажной, так как питание у микроорганизмов осуществляется по законам диффузии и осмоса.

По *консистенции* питательные среды бывают жидкие, полужидкие и плотные, сыпучие и сухие. Для приготовления плотных сред в жидкие среды добавляют агар-агар (2-3%), а для полужидких – 0,2-0,7%

По *происхождению* различают среды: естественные (молоко, сыворотка крови, картофель и т.д.) и искусственные; полусинтетические (продукты переработки мяса, молока, печени, растений, часто с добавлением к ним углеводов, глицерина и т.д.) и синтетические.

Искусственные питательные среды по *назначению* подразделяются на: простые (обычные), специальные (сложные), дифференциально-диагностические и элективные (избирательные).

Простые питательные среды служат для культивирования большинства микроорганизмов. Наиболее распространенными питательными средами являются мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА) и мясопептонная желатина (МПЖ).

Специальные среды предназначены для культивирования микроорганизмов, не растущих или плохо растущих на простых питательных средах. Так, имеются специальные среды для культивирования туберкулезных бактерий, возбудителя бруцеллеза, молочнокислых, маслянокислых бактерий, анаэробов и др.

Дифференциально-диагностические среды. Эти среды используют для определения видовой принадлежности культуры микроорганизма, для отличия одного вида бактерий от другого (среда Эндо, Плоскирева, висмут сульфитный агар и др.).

Элективные (избирательные) среды. Наличие определенного состава и концентрация питательных веществ, микроэлементов, ростовых и других факторов при строгом соблюдении рН обуславливает оптимальные условия для культивирования одного или нескольких видов микроорганизмов. При посеве материала, содержащего смесь микробов, интенсивно проявляется рост того вида, для которого созданы наиболее благоприятные условия для развития.

Самостоятельная работа:

- Приготовление МПБ;
- Приготовление МПА;
- Приготовление среды Китта-Тароцци;
- Уборка и дезинфекция рабочего места.

Методические указания к работе

Задание 1. Приготовление МПБ

- К 1 л мясной воды добавляют 1 % Пептона;
- 0,5 % поваренной соли;
- Устанавливают реакцию среды (рН 7,2-7,4);
- Кипятят;
- Фильтруют;
- Разливают по колбам;
- Стерилизуют при давлении 0,1 МПа 15-20 мин.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 2. Приготовление МПА

- К 1 л мясной воды добавляют 1 % Пептона;
- 0,5% поваренной соли;
- Устанавливают реакцию среды (рН 7,2-7,4);
- Кипятят;
- Фильтруют;
- Разливают по колбам;
- Стерилизуют при давлении 0,1 МПа 15-20 мин;
- Добавляют 2-3 % агар.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 3. Приготовление среды Китта-Тароцци

- В бульон Мартена (рН 7,2-7,4) с 0,3-0,5% глюкозы добавляют 0,1% агара.
- Среду разливают по 9 мл. в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или фарша, стерилизуют при 120°C 30 минут.
- Среду можно использовать, не заливая поверхность вазелиновым маслом.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 4. Уборка и дезинфекция рабочего места

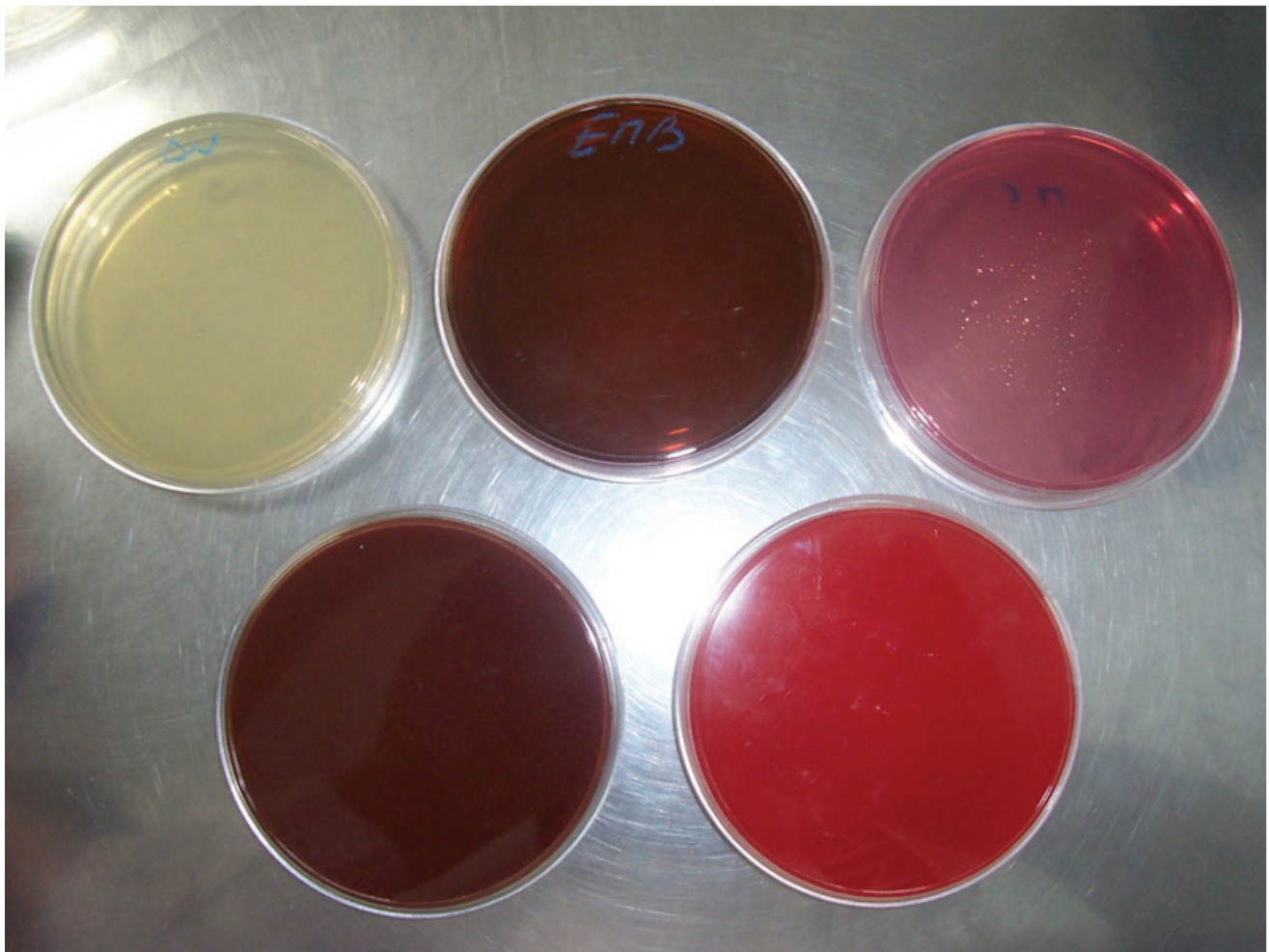
По окончании работы проведите уборку рабочих мест, сделайте заключительную дезинфекцию. Вымойте руки с мылом, а при необходимости обработайте их дезинфицирующим раствором.

Вопросы для закрепления

- 1. Простые питательные среды
- 2. Элективные среды (пример)
- 3. Дифференциально-диагностические среды (пример)
- 4. Индикаторные среды (пример)
- 5. Консервирующая среда (пример)
- 6. Колонии бактерий (какие бывают)
- 7. Чистая культура
- 8. Смешанная культура
- 9. Ассимиляция у микроорганизмов
- 10. Диссимиляция у микроорганизмов
- 11. Культура ткани
- 12. Рост бактерий

Студент _____ Преподаватель _____

Приложение к занятию №3



Занятие 4

Тема: «Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам»

Время – 90 минут

Цель: уточнить и закрепить знания о возбудителях бактериальных, кишечных, респираторных, кровяных инфекций; изучить антибактериальные препараты, их действие на микроорганизмы.

Задачи:

Студент должен знать:

- возбудителей бактериальных, кишечных, респираторных, кровяных инфекций;
- важнейшие группы химиотерапевтических средств, механизм их антимикробного действия.

Студент должен уметь:

- сделать посев культуры микроорганизмов на чувствительность к антибактериальным препаратам;
- определять, к каким препаратам чувствительны исследуемые микроорганизмы.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

Характеристика бактериальных инфекций «Энтеробактерии»

- Перечислите возбудителей кишечных инфекций.
- Что характерно для кишечных инфекций? Что общее у них?
- Какую форму имеют энтеробактерии?
- Какие энтеробактерии грам (-) и кто из них грам (+)?
- Какие энтеробактерии подвижны, а кто не имеет жгутиков?
- Какие энтеробактерии образуют споры и долго живут в почве?
- На каких питательных средах растут энтеробактерии, какие особенности культивирования холерного вибриона и палочки ботулизма?
- Какие энтеробактерии образуют эндотоксин и кто выделяет экзотоксин?
- Каким действием обладает эндотоксин энтеробактерии?
- Каким действием обладает экзотоксин и бактерии ботулизма?
- Какие инфекционные кишечные заболевания протекают наиболее тяжело, почему?
- Какой патогенный материал исследуется и какими методами?
- Какова профилактика кишечных инфекций?

Возбудители респираторных инфекций

- Перечислите возбудителей респираторных инфекций.
- Что характерно для респираторных инфекций? Что общее у них?
- Какую форму имеют возбудители респираторных инфекций?
- Какие из них окрашиваются по Граму, по Цилю-Нильсену и как окрашиваются?
- Кто из них имеет споры, жгутики, капсулы?
- На каких питательных средах выращивают возбудителей респираторных инфекций?
- Кто из них выделяет экзотоксин и ферменты агрессии?
- Какова клиника, лечение и профилактика оспы?
- Какова клиника и профилактика сапа?
- Какова клиника и профилактика бруцеллеза?
- Какова клиника и профилактика туберкулеза?

Возбудители бактериальных кровяных инфекций

- Перечислите возбудителей кровяных инфекций.
- Охарактеризуйте возбудителя чумы. Назовите источники и пути передачи.
- Расскажите о патогенезе, клинике, диагностике и профилактике чумы.
- Кто является возбудителем тифа птиц?
- Кто является возбудителем сибирской язвы?

Самостоятельная работа студентов:

1. Изучение антибактериальных препаратов, их действия на бактерии;
2. Определение чувствительности бактерий к лекарственным препаратам.

Методические указания к работе

Задание 1. Изучение антибактериальных препаратов и их действия на бактерии, используя таблицу

Выполнение работы

*Таблица
Изучение антибактериальных препаратов*

Название препарата	К какой группе препаратов относится	Чувствительные микроорганизмы	Механизм противомикробного действия

Задание 2. Посев бульонной культуры стафилококка. Постановка пробы на чувствительность к антибиотикам. Методика посева

1. Зажгите спиртовку; работайте в стерильном поле спиртовки;
2. Откройте чашку Петри с мясо-пептонным агаром;
3. Откройте пробку пробирки с бульонной культурой стафилококка и возьмите 0,05 мл. культуры стерильной пипеткой;
4. Перенесите культуру на питательную среду;
5. Поставьте отработанную пипетку в дезинфицирующий раствор 0,5 % р-р хлорамина;
6. Закройте пробирку пробкой над зажженной спиртовкой, поставьте ее в штатив;
7. Возьмите шпатель, простерилизуйте его над пламенем, охладите;
8. Разотрите культуру шпателем по поверхности питательной среды (методом газона);
9. Простерилизуйте шпатель над пламенем и поставьте его в штатив;
10. Возьмите флакон с дисками, достаньте пинцетом диск с антибиотиком и поместите его на засеянную культуру. Так же положите равномерно и остальные диски с антибиотиками;
11. Работайте с дисками внимательно и аккуратно;
12. Закройте чашку Петри с готовыми посевами, напишите номер и поставьте в термостат для выращивания (при $t^{\circ} 37^{\circ}$ на 18 – 24 часа).

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Работа 3. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

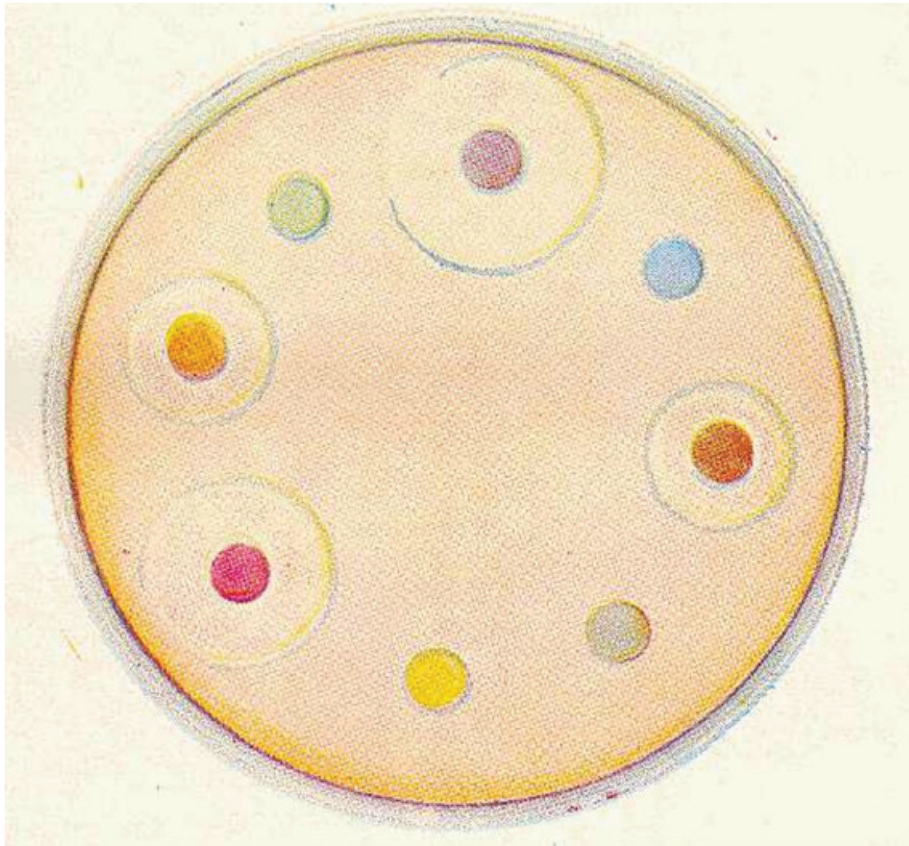
1. Возьмите чашки Петри с готовой пробой чувствительности стафилококка к антибиотикам;
2. Рассмотрите результат пробы. Бактерицидное действие различных антибиотиков на микробы определяют по зоне задержки их роста вокруг бумажных дисков с антибиотиками;
3. Измерьте линейкой диаметр зоны просветления;
4. Запишите и зарисуйте результат исследования;
5. Сделайте вывод, учитывая, что диаметр зоны просветления:
 - 25 – 30 мм. – означает хорошую чувствительность микроорганизмов (+ + +),
 - 20 – 25 мм. – микроорганизмы чувствительны (+ +),
 - 10 – 20 мм. – малочувствительны (+),
 - Менее 10 мм. – не чувствительны.

Сокращение названий антибиотиков, применяемых в бактериологической лаборатории

<i>Гентамицин</i>	Ген	<i>Левифлоксим</i>	ЛФЦ
<i>Цетифоксин</i>	ЦТК	<i>Меропенин</i>	МПН
<i>Левомецетин</i>	ЛЕВ	<i>Ципрофлоксацин</i>	ЦПР
<i>Фурадонин</i>	ФД	<i>Цепелин</i>	ЦПМ
<i>Медоцеф</i>	Белого цвета диск	<i>Цефазолин</i>	ЦЗ
<i>Канамицин</i>	Кан	<i>Фампицин</i>	ФП
<i>Цефазолин</i>	Цз	<i>Цифотоксин</i>	ЦФК
<i>Рифамицин</i>	Риф	<i>Бензилпенициллин</i>	Пен
<i>Доксициклин</i>	Док	<i>Офлоксацин</i>	Оф
<i>Ампициллин</i>	Амп	<i>Линкомицин</i>	Ли
<i>Амоксилав</i>	АМК	<i>Амикацин</i>	Ан

Приложение к занятию № 4

Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом дисков



Определение чувствительности бактерий к антибиотикам



Индикаторные диски

Чувствительность микроорганизмов к сульфаниламидам

Наименование препарата	Гомолитический стрептококк	Менингококк	Пневмококк	Стафилококк	Кишечная группа
Стрептоцид	+++	++	+	0	+
Норсульфазол	+	+++	+++	+++	+++
Сульфадимезин	+++	+++	+++	+	+++
Этазол	++	++	++	0	+++
Сульфадиметоксин	+++	0	+++	++	+++
Фталазол	0	0	0	0	+++

Условные обозначения: количество (+/ –) степень чувствительности микроорганизма к препарату.

Механизм действия сульфаниламидов: сульфаниламиды нарушают обмен веществ в микробной клетке.

Характеристика основных антибиотиков

Наименование антибиотика	Продуцент	Чувствительные микроорганизмы	Механизм противомикробного действия
Пенициллин	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium notatum</i> и др.	Гноеродные кокки грамположительные бактерии, трепонемы, боррелии, хламидии (возбудитель орнитоза)	Блокируют образование клеточной стенки
Циклосерин	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Грамположительные и кислотоупорные бактерии, риккетсии, хламидии	Приводит к нарушению образования пептидных мостиков в гликопептидном слое клеточной стенки
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	Туберкулезные микобактерии, грамотрицательные (в том числе возбудители чумы, бруцеллеза)	Изменяет конформацию рибосом, что приводит к нарушению синтеза полипептидной цепи
Неомицин, мономицин, канамицин, гентамицин	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Actinomyces circulatus</i> , <i>Streptomyces kanamycetius</i>	Грамположительные, многие грамотрицательные бактерии и некоторые простейшие	Прекращают синтез полипептидной цепи

Левомецетин (хлорамфеникол)	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии, риккетсии, хламидии	Нарушают образование пептидной связи между аминокислотами полипептидной цепи
Тетрациклины: хлортетрациклин, морфоциклин др.	<i>Streptomyces furefaciens</i> <i>Streptomyces rimosus</i> и др.	Грамположительные, многие грамотрицательные бактерии, лептоспирры, риккетсии, хламидии, микоплазмы	Приводят к нарушению синтеза полипептида
Эритромицин, олеандомицин	<i>Streptomyces erythraeus</i> , <i>Streptomyces antibioticus</i>	Грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии	Блокируют перенос аминокислот от тРНК к рибосоме, в результате чего прекращается наращивание полипептидной цепи
Нистатин, леворин	<i>Streptomyces noursei</i> , <i>Actinomyces levoris</i>	Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i> простейшие (амебы, лейшмании, трихомонады)	Нарушают морфологическую структуру и функциональные свойства грибов

Характеристика различных групп антибиотиков

Группа пенициллина <i>(наименее токсична для организма и более эффективна против м/о. Выделена из зеленой плесени)</i>	
Название	Механизм действия
1. Бензилпенициллин 1. Левомецетин	<i>В виде натриевой и калиевой соли вводится парентерально. Действие 12 часов. Пролонгированное действие у бициллина-1, бициллина-2, бициллина-3.</i>
2. Синтомицин 3. Тетрациклины 2. Феноксиметилпенициллин	<i>Вводится перорально, т.к. он устойчив к кислой среде желудка.</i>
3. Полусинтетические ампициллин, карбенициллин, метициллин, оксациллин, клоксациллин.	<i>Нарушают синтез клеточной стенки бактерий.</i>
Антибиотики широкого спектра действия <i>(эффективны в отношении многих микроорганизмов: грам(+), грам(-) бактерий, риккетсий, вирусов, простейших)</i>	
Применяются в виде таблеток, капсул, суспензий, мази и свеч: тетрациклин, хлортетрациклин, метациклин, олететрин; в виде растворов внутримышечно вводят – гликициклин, окстетрациклин; внутривенно – морфоциклин и олеморфоциклин.	

	<i>Применяется при лечении кишечных инфекций, брюшного тифа и паратифов, дизентерии, бруцеллеза, туляремии, коклюша, пневмонии, гонореи, сыпного тифа, трахомы, орнитоза и др. Он не действует на анаэробы, простейшие и микобактерии туберкулеза.</i>
	<i>Токсичен и применяется только наружно, в виде мазей, линиментов, эмульсий для лечения гнойных заболеваний кожи и слизистых.</i>
	<i>Получены из культуры лучистого грибка <i>Streptomyces anreofaciens</i> и <i>St. rimosus</i> в 1952 г. химическим путем. Они активны в отношении крупных вирусов, риккетсий, спирохет, простейших, грам(+), грам(-) бактерий. Их используют при лечении пневмонии, дизентерии, бруцеллеза, туляремии, коклюша, пневмонии, гонореи, сыпного тифа, трахомы.</i>
<i>Лечебные дозы действуют – бактериостатически, а более высокие – бактерицидно. Механизм действия – на функции рибосом, нарушая синтез белка в клетке, нарушают проницаемость клеточных мембран.</i>	
Аминогликозиды <i>(получены из лучистых грибков рода Стрептомицет. Эти препараты препятствуют считыванию генетического кода ДНК и РНК., при этом нарушая синтез белка в клетке и проницаемость клеточных мембран микроорганизмов)</i>	
1. Стрептомицин	<i>Действует на возбудителей чумы, бруцеллеза, шигеллы, сальмонеллы. Его применение ограничено вследствие токсического действия на кору черепно-мозговых нервов. Это приводит к снижению и потере слуха, пошатыванию при ходьбе и пр. При использовании стрептомицина микроорганизмы вырабатывают устойчивость к нему.</i>
2. Канамицин	<i>Используется при лечении туберкулеза парэнтерально</i>
3. Гентамицин	<i>Применяется при заболеваниях мочевыводящих путей и дыхательного тракта. Вводится парэнтерально.</i>
4. Неомицин	<i>Применяется только наружно</i>
5. Мономицин	<i>Менее токсичен и используется при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, вызванных сальмонеллами, шигеллами, дизентерийной амёбой.</i>

Возможность практического применения аминогликозидов ограничена нейро- и нефротоксическим действием препаратов.

Антибиотики резерва

1. Нистатин	<i>В эту группу входят: эритромицин, олеандолин, спирамицин, карбомицин, новоблоцин, ванкомицин, линкомицин, рифамицин. Применяются при лечении заболеваний, вызванных устойчивыми к пенициллину грамположительными микроорганизмами. Они менее активны и более токсичны.</i>
2. Леворин 3. Трихомицин 4. Микогептин и амфотерицин 5. Гризеофульфин	<i>Цефалоспорины</i>
	<i>В эту группу входят: цефалоризин, цефалотин. Полусинтетические цефалоспорины активны для различных грамположительных и грамположительных бактерий: кокков, клостридий, палочки сибирской язвы, сальмонелл, шигелл применяют внутримышечно при инфекции дыхательных и мочевыводящих путей, раневых и ожоговых инфекций. Минимально токсичны.</i>

Противогрибковые антибиотики

*(нарушают проницаемость клеточной мембраны грибов. Выделены из разных видов стрептомицет. Например, гризеофульфин – из зеленой плесени *Penicilium griseofulvum*)*

	<i>Используется в виде таблеток, мазей, свечей для лечения кандидомикозов слизистых оболочек рта, влагалища, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых органов, кожи. Для профилактики при длительном приеме антибиотиков широкого спектра действия.</i>
	<i>Применяется при кандидозе и аспиргиллезе легких и трихомониозе половых органов.</i>
	<i>Применяется при трихомониозе и кандидозе.</i>
	<i>Используется при глубоких системных микозах.</i>
	<i>Назначается при дерматомикозах (парше, трихофитии, микроспории) и при поражениях лимфатических узлов костей этими грибами.</i>

Противоопухолевые антибиотики	
<p><i>Влияют на синтез и метаболизм нуклеиновых кислот быстро растущих опухолевых клеток, а также дают выраженный противомикробный эффект. К ним относятся: диактиномицин, хромомицин – из аурелевой кислоты; дауномицин, рубомицин – группа антроциклинов; брунеомицин – группа стрептомицинов.</i></p> <p><i>Применяются при различных формах злокачественных новообразований. Высокотоксичные.</i></p>	
Антибиотики, полученные из бактерий	
1. Полимиксины	<p><i>Получены из бактерий <i>polimita</i>. Токсичны. Активны лишь в отношении бактериологической дизентерии, пастерелл, бруцелл, синегнойной палочки. Применяют при инфекции в легких, сепсисе, эндокардитах, абсцессах.</i></p>
2. Грамицидин	<p><i>Получены из бактерий <i>brevis</i>. Применяются местно, в виде мазей при лечении гнойных ран и язвенных поражений.</i></p>
Антибиотики, выделенные из высших растений	
1. Аллилсат	<p><i>40% спиртовая вытяжка из чеснока. Применяется при колитах.</i></p>
2. Сативин	<p><i>Настойка чеснока. Применяется при хронической дизентерии.</i></p>
3. Имманин	<p><i>Выделяется из травы зверобоя, при лечении гнойных ран, ожогов.</i></p>
<p><i>А также: фитонциды алоэ, мака, редиса, хрена.</i></p> <p><i>Из лишайников выделяют: натриевую соль фукусиновой кислоты, применяемой для лечения ран в хирургии.</i></p>	
Антибиотики животного происхождения	
<p><i>(в курином яйце – лизоцим, оказывающий бактериологическое (растворяющее) действие на многие патогенные и сапрофитные микроорганизмы. Используются для лечения кожных и глазных болезней)</i></p>	
1. Интерфероны	<p><i>Белковые низкомолекулярные вещества, вырабатываемые клетками организма при заражении вирусами. Обладают широким спектром действия, нарушают синтез нуклеиновых кислот. Не ядовит и высокоэффективен. У вирусов не возникает устойчивых к интерферону.</i></p>
2. Экмоклин	<p><i>Антибиотик из молок осетровых рыб (получен Ермольевой), удлиняет и усиливает действие пенициллина. Вводится внутримышечно вместе с бензилпенициллином, в качестве растворителя – экмоновоциллин.</i></p>

Занятие 5

Тема: «Взятие и пересылка патматериала для бактериологических исследований»

Время – 90 минут

Цель: уточнить и закрепить знания о возбудителях бактериальных кишечных, респираторных, кровяных инфекций; изучить антибактериальные препараты, их действие на микроорганизмы.

Задачи:

Студент должен знать:

- правила взятия и отбора патматериала для прижизненной и посмертной диагностики;
- инфекционные болезни, при которых отбирают патматериал для прижизненной диагностики болезней: волосы, участки кожи, кал, секрет молочных желез, содержимое синовиальных бурс и абсцессов, материал из язв и ран.

Студент должен уметь:

- отбирать патматериал у живых животных и у трупа;
- оформлять сопроводительную документацию.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

- Общие правила безопасности при работе с животными.
- Правила работы с инфекционно-больными животными и патологическим материалом.
- Отбор патматериала для прижизненной диагностики.
- Отбор патматериала для посмертной диагностики.
- Консервирование патологического материала.
- Упаковка и пересылка патологического материала.
- С какой целью проводится бактериальная диагностика?
- Какие методы используются в бактериальном исследовании?
- Правила взятия и пересылки патологического материала.
- Что можно отправить для бактериологического исследования от больного животного, от трупа животного?
- Оформление сопроводительного документа для отправления патматериала в лабораторию.
- В чем сущность окраски бактерий по методу Грама?
- Классификация питательных сред.
- Требования к питательным средам.

- Какие виды лабораторных животных используют для биопробы?
- С какой целью проводится заражения подопытных животных?

Микролекция

Отбор материала для прижизненной диагностики

В зависимости от вида инфекции у клинически больных животных берут соответствующий, специфический для данной болезни материал, соблюдая меры личной безопасности.

Секрет молочных желез служит объектом исследования при таких заболеваниях как туберкулез, бруцеллез, сальмонеллез, мастит. Перед отбором молока вымя обмывают теплой водой с мылом, а соски обрабатывают 70% спиртом. Первые струйки молока удаляют, а последующие набирают в стерильные сосуды, объемом 15-20 мл. У овец и коз пробы молока получают путем пункции цистерны вымени. Поле операции готовят у основания соска. Стерильной иглой, соединенной со шприцом делают пункцию и набирают в шприц секрет и переносят его в стерильные пробирки с резиновыми пробками.

Моча чаще всего служит объектом исследования на лептоспироз. У коров и свиноматок мочу можно брать с помощью катетера непосредственно из мочевого пузыря, либо при естественном мочеиспускании в чистые пробирки или банки. Легче всего мочу собирать после утреннего подъема животных, а у свиней в любое время дня после 1-2 часового лежания.

Кал берут из прямой кишки в стерильную посуду, которую закрывают плотной крышкой.

Выделения из верхних дыхательных путей, ротовой полости и половых органов собирают в посуду при естественном истечении или после предварительного обмывания водой крыльев носа и передней части носовых ходов. Выделения собирают стерильными тампонами из глубоких частей носа. Тампоны помещают в стерильные пробирки, содержащие по 0,5 мл. стерильного физиологического раствора.

Содержимое синовиальных бурс и абсцессов берут с помощью стерильного шприца с иглой большого диаметра после предварительного выстрига шерсти и обработки кожи 70% спиртом или 5-10% настойкой йода. Полученный пунктат переносят в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

Материал из язв и ран получают методом соскоба на границе пораженной и здоровой ткани.

Волосы, участки кожи исследуют при кожных заболеваниях. При этом, волосы выщипывают, а соскобы с кожи делают скальпелем на границе пораженных и здоровых тканей.

Кровь для серологических исследований берут в разгар заболеваний, а в некоторых случаях повторно через 2 недели.

Отбор материала для посмертной диагностики

Патологический материал отбирается и отправляется в лабораторию: зимой не позднее 12 ч. после гибели животного, а летом не позднее 6 ч. Подвергнувшийся разложению патологический материал для исследования в лаборатории непригоден.

Для **бактериологического** исследования в лабораторию отправляют кусочки кожи, слизистых оболочек, паренхиматозных органов (от печени с желчным пузырем), трубчатую кость, спинной и головной мозг, лимфатические узлы, пробы жидкости из грудной и брюшной полостей, отрезок кишечника, перевязанный лигатурами, плод, плодные оболочки. Пробы из каждого органа помещают в отдельную посуду (пакет) и маркируют. В каждом отдельном случае необходимо брать тот материал, в котором имеются характерные патологические изменения, обусловленные возбудителем и которого можно выделить из данного материала.

Для **вирусологического** исследования материалом, как правило, служат кровь или сыворотка, смывы из носоглотки, стенки и содержимое афт, папулы (узелки), везикулы (серозные пузырьки), пустулы (гнойные пузырьки), а также кусочки головного мозга и паренхиматозных органов.

Для **гистологического** исследования патматериал следует брать от свежих трупов, из всех органов и тканей, где обнаружены те или иные патологические изменения. Из разных участков патологически измененных органов или тканей следует вырезать кусочки, площадью 3-4 см² и толщиной не более 1-2 см. Вырезая пораженные участки, необходимо захватывать и граничащую с ними нормальную ткань.

Патологический материал берут стерильно. Поверхность органа, из которого необходимо взять кусочек материала, предварительно обжигают ватным спиртовым тампоном или прижигают нагретым металлическим шпателем. Инструменты кипятят в воде в течение 30 мин, а непосредственно перед взятием материала дополнительно смачивают денатурированным спиртом и обжигают на пламени. Вырезанные кусочки помещают в стерильную посуду.

После взятия материал тотчас помещают в стеклянную посуду с фиксирующей жидкостью, объем которой должен превышать в 10 раз объем взятого материала. Фиксировать лучше всего 10% водным раствором продажного формалина, а если нет формалина – 96⁰ спиртом.

Нервную систему (головной мозг, спинной мозг) лучше фиксировать в 10% нейтральном формалине. Нейтрализуют формалин, прибавляя в него сухой мел или углекислую магнезию до 1/10-1/20 объема формалина.

Жидкий материал можно набирать в одноразовые шприцы или вакуумные пробирки для отбора крови. Кроме того, различные выделения можно посылать в виде мазков или мазков отпечатков, которые высушивают на воздухе и заворачивают каждый в отдельности в пергаментную бумагу и маркируют.

Самостоятельная работа студентов:

1. Консервирование патологического материала;

2. Упаковка и пересылка патологического материала;
3. Порядок оформления и отправки сопроводительных документов к патматериалу, направляемому на исследование.

Методические указания к работе

Задание 1. Консервирование патологического материала

Полученные пробы отправляют в лабораторию не позднее 12 ч. Если это невозможно, то материал консервируют.

Материал, предназначенный для бактериологического исследования консервируют 30% раствором глицерина, приготовленным на физиологическом растворе или вазелиновым маслом. Соотношение патматериала и консерванта должно быть не менее 1:4 – 1:5.

Трубчатую кость и кишечник обычно консервируют поваренной солью.

Для вирусологического исследования материал консервируют 30-50% раствором глицерина, приготовленном на стерильном физрастворе.

Наилучший метод сохранения бактерий и вирусов в патматериале – охлаждение.

Для этого биоматериал замораживают в бытовом холодильнике при следующем отправляют в лабораторию, исключая разморозку во время транспортировки. Для этого в летнее время перевозить замороженный материал необходимо в термотаре или термосе.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 2. Упаковка и пересылка патологического материала

Отобранный материал (каждый орган или ткань в отдельности) упаковывают в чистые полиэтиленовые пакеты, после чего их объединяют в общий пакет и вкладывают бирку с данными на этот материал. Трупы мелких животных и птицы отправляют целиком, упаковывая их в чистые, без повреждений полиэтиленовые мешки. На отобранный и упакованный материал оформляется сопроводительный документ (см. приложение на стр. 58), после чего он отправляется в ветеринарную лабораторию с нарочным.

При подозрении на особо опасные инфекции (сибирская язва, сепсис, бруцеллез, туляремия, эмфизематозный карбункул, повальное воспаление легких крупного рогатого скота, чума крупного рогатого скота, свиней, птиц, ящур, бешенство) отправляют материал в стеклянной посуде, вкладывают в металлический пенал (коробку), который запаивают, пломбируют или опечатывают, а затем упаковывают в деревянный ящик. На лицевой стороне ящика вверху делают надпись «Осторожно стекло».

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 3. Порядок оформления и отправки сопроводительных документов к патматериалу, направляемому на исследование

1. Первый экземпляр сопроводительного документа помещают в контейнер, а второй передают с нарочным.
2. В сопроводительном письме указывают: вид, пол и возраст животного, от которого взят материал для исследования, его номер, или кличка, на какое исследование посылается материал, краткое описание клинических признаков и патологоанатомических изменений.
3. Если нет возможности напечатать сопроводительные документы, напишите разборчиво или печатными буквами.
4. При посылке корма указывают его название, дату взятия образца, с какого угодья. Если корм получен с завода или заготовительного пункта, указывайте с какого именно, место взятия (склад, с кормушек и т.д.)
5. При необходимости к письму прилагают дополнительные сведения, в частности, какая помощь оказана животному, какие лекарственные средства применялись, с какого времени скармливался корм животным и т.д.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Вопросы для закрепления

1. Общие правила безопасности при работе с животными.
2. Правила работы с инфекционно-больными животными и патологическим материалом.
3. Отбор патматериала для прижизненной диагностики.
4. Отбор патматериала для посмертной диагностики.
5. Консервирование патологического материала.
6. Упаковка и пересылка патологического материала.

Студент _____ Преподаватель _____

Приложение к занятию №5

Форма сопроводительного документа к пересылке патологического материала в ветеринарную лабораторию

Сопроводительная

В _____ ветеринарную лабораторию

Адрес: _____

При этом направляется для _____

Патологический материал (перечислить какой) _____

от _____, принадлежащего _____

(вид, возраст животного)

_____ (наименование хозяйства, фермы, отделения, Ф.И.О. владельца животного)

Дата заболевания животного _____

Дата падежа _____

Клиническая картина _____

Дата патологоанатомического вскрытия _____

Предположительный диагноз _____

Дата отправки материала _____

_____ (должность)

_____ (подпись)

Форма сопроводительного документа к пробам крови

Сопроводительная

Отметка лаборатории _____

Дата поступления материала _____

Доставлено проб _____

Забракован _____

В _____ ветеринарную лабораторию

Адрес: _____

При этом направляется _____ проб крови (сыворотки) от _____

_____, принадлежащего _____

(вид животного)

(наименование хозяйства, населенного пункта, района)

Для _____ исследования на _____

(вид исследований)

(название заболевания)

Хозяйство, бригада, отара, гурт _____

(благополучное, неблагополучное)

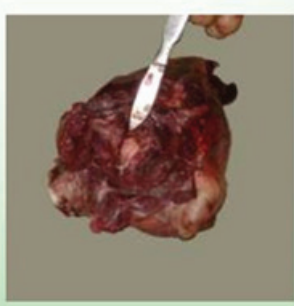
_____ (указать вакцину, дату вакцинации)

Исследование первичное, повторное (подчеркнуть) _____

Дата и результат предыдущего исследования _____

Дата взятия крови _____

Усовершенствованный способ отбора проб
головного мозга (отбор через затылочное отверстие)







Занятие 6

Тема: «Серологическая диагностика бруцеллеза РА»

Цель: изучить метод диагностики РА на бруцеллез; закрепить знания о механизме возникновения антител и увидеть практическое взаимодействие антител с антигеном; уточнить и закрепить знания о возбудителях бруцеллеза.

Время – 180 минут

Задачи:

Студент должен знать:

- факторы неспецифической защиты организма;
- факторы специфической защиты организма;
- антигены, их свойства и виды;
- антитела, виды иммуноглобулинов.

Студент должен уметь:

- провести реакцию агглютинации в пробирке;
- прочесть результат реакции и проанализировать их.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

- Антигены – какова их химическая структура и способы введения в организм?
- Свойства антигенов. От чего зависит антигенность?
- Антигены микробных клеток.
- Антигены животных микроорганизмов.
- Антитела. Виды антител (антибактериальные, антитоксические, противовирусные, противогрибковые, аутоантитела, антиклеточные, естественные).
- Виды антибактериальных антител, их взаимодействие с антигенами (агглютинины, преципитины, лизины, опсоины, бактерицидные).
- Химическая природа антител. Виды иммуноглобулинов и их значение.
- Взаимодействие между антигеном и антителом; использование серологических реакций.
- Виды серологических реакций, применение иммунных реакций в ветеринарии.

Самостоятельная работа:

1. Постановка реакции агглютинации в пробирке;
2. Провести учет реакции и дать анализ.

Микролекция

Бруцеллез – хронически протекающая инфекционная болезнь животных, вызываемая бактериями рода *Brucella*, в который входят 6 самостоятельных видов: *B. melitensis* – возбудитель бруцеллеза у коз и овец, *B. abortus* – у крупного рогатого скота, *B. suis* – у свиней, северных оленей, зайцев, *B. ovis* – у овец, *B. canis* – у собак, *B. neotomae* – у древесных крыс. *B. melitensis* и *B. abortus* могут мигрировать на животных других видов. От больных животных могут заразиться люди, для которых наиболее опасен возбудитель бруцеллеза овец и коз.

Диагноз на бруцеллез основан на результатах бактериологических, серологических, аллергических исследований и клинико-эпизоотических данных.

Клинические признаки болезни у животных нехарактерны – аборт, артриты, бурситы, эндометриты, вагиниты, орхиты, эпидидимиты могут встречаться при многих других заболеваниях.

Патологоанатомические изменения при бруцеллезе также малохарактерны. Самый надежный и точный диагноз – лабораторный, т. е. выделение и дифференциация возбудителя.

Серологическая диагностика бруцеллеза заключается в обнаружении специфических антител в сыворотке крови животных в реакции агглютинации (РА) в пробирках, реакции связывания комплемента (РСК), реакции длительного связывания комплемента на холоде (РДСК), реакции иммунодиффузии с 0-полисахаридным антигеном (РИД), пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба - РБП) и в молоке коров - кольцевой реакции (КР) и других реакциях, утвержденных в установленном порядке.

Заболевание считают установленным, если в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота выявлены ранее не вакцинированные животные, положительно реагирующие в РА с титром антител 100 МЕ/мл и выше или (и) в РСК (РДСК) в разведении 1 : 5 и выше.

Методические указания к работе

Задание 1. Постановка реакции агглютинации в пробирке

Компоненты реакции агглютинации:

- испытуемые сыворотки крови;
- позитивная бруцеллезная сыворотка, изготовленная биопредприятием;
- негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных из опыта или консервированная), изготовленная биопредприятием или полученная в лаборатории;
- антиген бруцеллезный единый для РА;
- 0,5%-ный фенолизированный раствор хлорида натрия.

Примечание

- при исследовании сывороток крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, собак, пушных зверей и морских свинок для разведения испытуемых сывороток и антигена используют фенолизированный физиологический раствор хлорида натрия (0,85%-ный);
- при исследовании крови овец и коз - 5%-ный и оленей (маралов) - фенолизированный 10%-ный раствор хлорида натрия;
- при исследовании сывороток крови овец, коз, оленей (маралов) и собак - 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200;
- крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов - 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400;
- пушных зверей и морских свинок - 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

Постановка реакции агглютинации:

Реакцию агглютинации проводят в серологических пробирках в объеме 1 мл в четырех разведениях.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок. В пробирках первого ряда делают исходное разведение. Для этого сыворотку крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов берут в дозе 0,1 мл., вносят в пробирку, добавляют к ней 2,4 мл. соответствующего раствора хлорида натрия, смешивают и получают разведение сыворотки 1:25. Сыворотку крови овец, коз, оленей (маралов) и собак берут в дозе 0,2 мл. и добавляют 2,3 мл. соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:12,5), а сыворотку крови пушных зверей и морских свинок берут в дозе 0,3 мл. и добавляют 1,2 мл. соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:5). Таким образом делают исходное разведение испытуемых сывороток в пробирках первого ряда штатива (по 10 проб в ряду).

После приготовления исходного разведения сывороток в первом ряду в пробирки третьего, четвертого и пятого рядов вносят по 0,5 мл соответствующего раствора хлорида натрия. Затем из пробирок первого ряда при помощи группового дозатора Флоринского или индивидуальных пипеток-дозаторов переносят в пробирки второго и третьего рядов по 0,5 мл исходного разведения сывороток (1:25; 1:12,5 или 1:5). В пробирках третьего ряда сыворотки смешивают, по 0,5 мл. этого разведения переносят в пробирки четвертого ряда и так же из пробирок четвертого ряда - в пятый. Из пробирок пятого ряда 0,5 мл жидкости удаляют. Таким образом делают последовательные двукратные разведения сывороток.

После этого в каждую пробирку второго, третьего, четвертого и пятого рядов с разведенными сыворотками вносят при помощи группового дозатора Флоринского или другого дозирующего устройства по 0,5 мл. антигена, предварительно разведенного 1:10 соответствующим раствором хлорида натрия. После добавления антигена разведение сыворотки в каждой пробирке удваивается и, в зависимости от вида исследуемых животных, будет составлять 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400; 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200 или 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

В пробирки первого ряда бруцеллезный антиген не вносят, они служат контролем

качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты реакции агглютинации не учитывают.

При массовых исследованиях сыворотки разливают индивидуальной микропипеткой (с грушей) или групповыми дозаторами Флоринского в две пробирки в дозах 0,02 и 0,01 мл. (сыворотки крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов) или 0,04 и 0,02 мл. при исследовании сывороток овец, коз, оленей (маралов) и собак. Затем в каждую пробирку добавляют по 1,0 мл. антигена, разведенного соответствующим раствором хлорида натрия 1:20. При этом разведения сывороток будут соответственно 1:50 и 1:100 или 1:25 и 1:50.

Выполнение работы

Постановка реакции в рисунке



Задание 2. Провести учет реакции и дать анализ

Результаты реакции учитывают визуально, определяя степень просветления жидкости, внешний вид агглютината (при его наличии) или антигена на дне пробирки, затем, после легкого встряхивания, оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) – полное просветление жидкости, микробные клетки антигена осели на дно пробирки в виде «зонтика», при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100% агглютинации);

+++ (3 креста) – неполное просветление жидкости и хорошо выраженный «зонтик» (75% агглютинации);

++ (2 креста) – неполное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен (50% агглютинации);

+ (1 крест) – едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (25% агглютинации);

- (минус) – просветления жидкости и образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки по центру образуется небольшой осадок микробов антигена в виде точки или пятна. При встряхивании осадок легко разбивается, поднимается вверх в виде косички и равномерно распределяется в жидкости, которая при этом приобретает первоначальную мутность.

За титр антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация на 2 креста (++) , что соответствует количеству международных единиц (МЕ) антител в 1 мл. сыворотки (например, сыворотка с титром 1:100 содержит 100 МЕ, 1:200 - 200 МЕ и т.д.).

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 75, 50, 25 и 0% просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно наливают 1, 2, 3 и 4 мл антигена, разведенного 1:10. Затем в том же порядке в три первые пробирки добавляют 3, 2 и 1 мл. физиологического раствора. В четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхивания пробирок из каждой из них переносят по 0,5 мл. в серологические пробирки и добавляют по 0,5 мл. физиологического раствора. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости. В четвертой пробирке просветление отсутствует. Стандарты мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате одновременно с основной реакцией.

Выполнение работы

Учет реакции

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

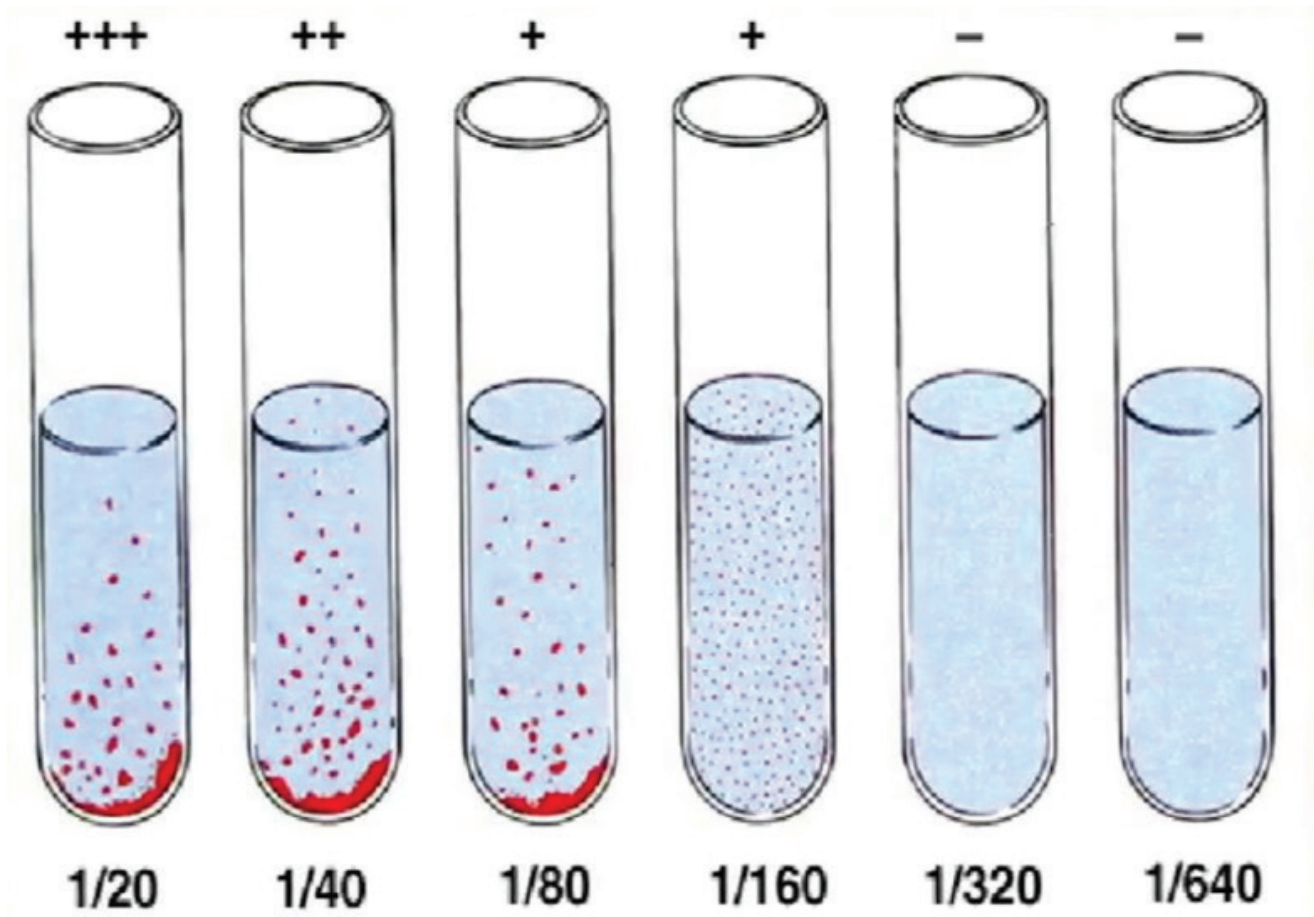
.....

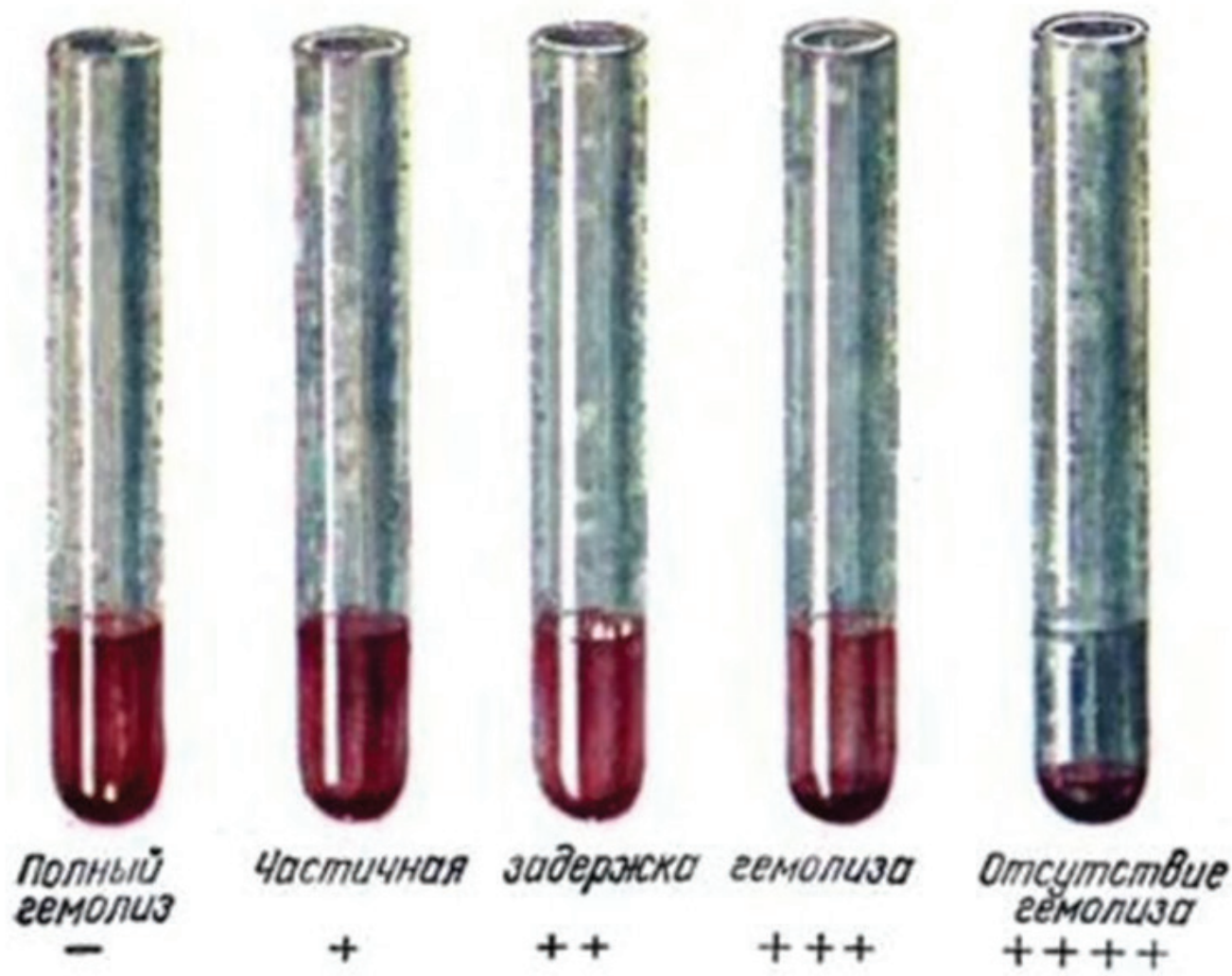
Вопросы для закрепления

1. Серологический тест, который используется для выявления бруцеллеза, реакция.
2. Группа мелких (0,3-0,6 мкм.) патогенных бактерий шаровидной или палочковидной формы, вызывающих у животных бруцеллез.
3. Симптом бруцеллеза.
4. Ученый, который, совместно с Райтом, впервые предложил для диагностики бруцеллеза реакцию агглютинации.
5. Ученый, который впервые описал симптомы бруцеллеза.
6. Введение антигенного материала с целью вызвать иммунитет к бруцеллезу, который предотвратит заражение или ослабит его последствия.
7. Когда наступает образования «зонтика» в реакции.

Студент _____ Преподаватель _____

Приложение к занятию №6





Занятие 7
Тема: «Реакция иммунодиффузии (РИД)
для диагностики лейкоза КРС»

Цель: изучить сущность и технику постановки реакций иммунодиффузии

Время – 180 минут.

Задачи:

Студент должен знать:

- как рассчитать индекс нейтрализации;
- технику разлива агара в лунки;
- методику изготовления лунок в слое агара.

Студент должен уметь:

- разливать по лункам компоненты РИД;
- изготавливать лунки;
- производить учет результатов РИД;
- производить учет реакции.

Контроль исходного уровня знаний

Вопросы для обсуждения:

- К центральным органам иммунной системы относятся.
- Какие клетки продуцируют антитела?
- Гаптенами являются.
- Проникновению возбудителя через слизистую оболочку препятствуют иммуноглобулины класса.
- Гиперчувствительность замедленного типа обусловлена.
- К клеткам, осуществляющим специфический иммунный ответ, относятся.
- Компоненты, необходимые для реакции агглютинации.
- С какой целью используют реакцию иммунодиффузии?
- После перенесенного заболевания вырабатывается следующий вид иммунитета;
- После введения иммунной сыворотки формируется следующий вид иммунитета.

Самостоятельная работа:

- Постановка реакции Рид.
- Учет реакции.

Микролекция

Лейкоз крупного рогатого скота – хроническая инфекционная болезнь, вызываемая вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Лейкозом болеет крупный рогатый скот всех возрастов. Клинически болезнь проявляется чаще у животных в возрасте старше 4 лет.

Болезнь протекает вначале бессимптомно, затем проявляется персистентным лимфоцитозом или образованием опухолевидных разрастаний в кроветворных и других органах и тканях.

Возбудителем лейкоза крупного рогатого скота является опухолеродный РНК-содержащий вирус из семейства Retroviridae.

Источник возбудителя инфекции - животное, зараженное ВЛКРС.

Факторами передачи являются кровь, молоко и другие секреты и экскреты, содержащие лимфоидные клетки, инфицированные ВЛКРС.

Заражение также может происходить при совместном содержании здоровых и инфицированных ВЛКРС животных.

Основу диагностики лейкоза крупного рогатого скота составляет серологический метод исследования - реакция диффузионной преципитации (РДП), иначе называемая реакцией иммунодиффузии в геле агара (РИД).

Из числа положительно реагирующих в РИД животных (инфицированных ВЛКРС) с помощью гематологического метода выявляют больных лейкозом.

Метод основан на обнаружении в сыворотке крови животных специфических преципитирующих антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота. Специфические антитела появляются в крови через 2-8 недель после заражения животного ВЛКРС и сохраняются в организме пожизненно.

Пробы крови для исследований берут не ранее чем через 30 суток после введения животным вакцин и аллергенов, у стельных животных – за 30 суток до отела или через 30 суток после него.

Сыворотки для исследования получают из крови испытуемого животного в количестве 2-3 мл. и направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают название хозяйства, номер (кличку), возраст, пол, породу животного. Кровь (для получения сыворотки) берут в бактериологические пробирки, выдерживают 1-2 ч. в теплом месте (не выше 40°C). После каждой пробы, для лучшего отделения сыворотки образовавшийся сгусток обводят в пробирке профломбированной проволокой. После этого пробирки выдерживают в течение 20-24 ч. при 4-10°C. При невозможности быстрого исследования подготовленные сыворотки хранят в замороженном состоянии.

Для постановки РИД используют набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота, в состав которого входят: сухой специфический антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, разбавитель антигена, специфическая преципитирующая сыворотка (СПС) к вирусу лейкоза, солевая смесь агара (ССА) и разбавитель ССА, контрольные сыворотки: отрицательная, положительная, слабopоложительная и положительная с антителами к р-24 антигену ВЛКРС.

Методические указания к работе

Задание 1. Постановка реакции

Оборудование и реактивы:

- чашки Петри диаметром 100 мм;
- стандартный штамп-пробойник для пресечения лунок в агаре;
- дозаторы со сменными наконечниками;
- рН-метр;
- осветитель;
- хлорид натрия (х.ч.);
- дистиллированная вода.

Подготовку компонентов реакции к работе осуществляют в соответствии с «Наставлением по применению набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота». Антиген растворяют в 5 см³ разбавителя. Растворенный антиген хранят при температуре 4°С не более двух недель.

Разбавитель ССА и солевую смесь агара переносят в колбу и приливают дистиллированную воду до объема 200 см³, затем колбу помещают в водяную баню и выдерживают до полного расплавления гранул агара. Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-70°С, разливают слоем 2-3 мм. (12-15 мл.) в обезжиренные чашки Петри и оставляют их приоткрытыми при комнатной температуре в течение 1 ч. После застывания агара специальным штампом-пробойником делают лунки в геле, не допуская образования трещин между ними и отслоения агара от дна чашки. В каждой чашке делают по 5 фигур, каждая из которых состоит из 7 лунок: одна в центре, остальные по периферии.

Антиген, контрольные и испытуемые сыворотки вносят в лунки каждой фигуры дозатором со сменными наконечниками.

Антиген (А) вносят в центральную лунку, две диаметрально противоположные лунки заполняют контрольной сывороткой (КС). Оставшиеся в фигуре 4 периферические лунки (1,2,3,4) заполняют испытуемыми сыворотками. Лунки заполняют доверху, не допуская переливания жидкости через край. После заполнения всех лунок чашки Петри закрывают крышками и ставят в термостат при T= 20 на 48 ч.

Выполнение работы

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Задание 2. Учет реакции

Примечание: Реакцию учитывают не ранее, чем через 48 ч и не позднее, чем через 96 ч.

Чашки просматривают на темном фоне, направляя сфокусированный луч осветителя на дно чашки под углом 30-45°. Реакцию оценивают только в том случае, если в геле агара между лунками сформирована четкая линия преципитации. Если она отсутствует или слабо выражена, то реакцию следует повторить.

Специфическая линия преципитации, формируемая преципитирующей контрольной сывороткой и антигеном, должна быть четкой, иметь форму прямой, располагаться на одинаковом расстоянии от лунок с антигеном и контрольной сывороткой. Неспецифической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном, но не сливается с контрольной линией преципитации, а пересекает ее или упирается в нее, образуя угол.

В зависимости от наличия специфических антител против антигенов ВЛКРС в испытуемой сыворотке реакцию оценивают как положительную или отрицательную. Положительной считают реакцию, если между лунками с антигеном и испытуемой сывороткой образуется полоса преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя непрерывную линию, то есть идентична ей.

- если линия преципитации между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном отсутствует, но контрольная линия преципитирующей сыворотки образует вблизи лунки с испытуемой линией изгиб, направленный в сторону лунки с антигеном – слабоположительная сыворотка;
- если контрольная линия значительно укорочена со стороны лунки с испытуемой сывороткой и имеет размытый изгиб к лунке с антигеном или образует линию преципитации, расположенную очень близко от лунки с антигеном – резко положительная сыворотка.

Положительно реагирующая сыворотка может образовывать вторую линию преципитации, которая располагается ближе к лунке с испытуемой сывороткой. Эта линия указывает на наличие в сыворотке преципитирующих антител против второго антигена (p24) ВЛКРС.

При образовании толстой, короткой, без загибов контрольной линии преципитации, не достигающей до лунки с испытуемой сывороткой, необходимо провести раститровку этой испытуемой сыворотки физраствором до получения результата, который можно будет оценить как отрицательный, положительный или неспецифический. Для этого необходимо физиологический раствор в объеме 100-500 мкл. разлить в пробирки или в лунки стандартных пластиковых плат для постановки серологических реакций (количество пробирок или лунок соответствует числу необходимых разведений). В первую пробирку или лунку с физраствором внести такой же объем сыворотки, тщательно перемешать и перенести той же пипеткой в том же объеме в следующую пробирку или лунку, затем после перемешивания – в следующую и т.д.

В результате в первой пробирке или лунке испытуемая сыворотка разведена в 2 раза, во второй – в 4 раза, в третьей – в 8 раз и т.д.

Реакцию считают отрицательной, если контрольная линия продолжается до лунки с испытуемой сывороткой без загиба.

В случаях, когда линия преципитации плохо просматривается или имеется зона опалесценции вокруг лунок, реакцию следует переставить.

Сдвиг контрольной линии преципитации в сторону лунки с антигеном или с контрольной сывороткой указывает на нарушение соотношения антигена и антител в тест-системе. В этом случае необходимо использовать другую серию диагностического набора.

Животных, сыворотки крови которых дали положительный результат в РИД, признают зараженными вирусом лейкоза и их необходимо исследовать гематологическим методом.

Выполнение работы

Учет реакции

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

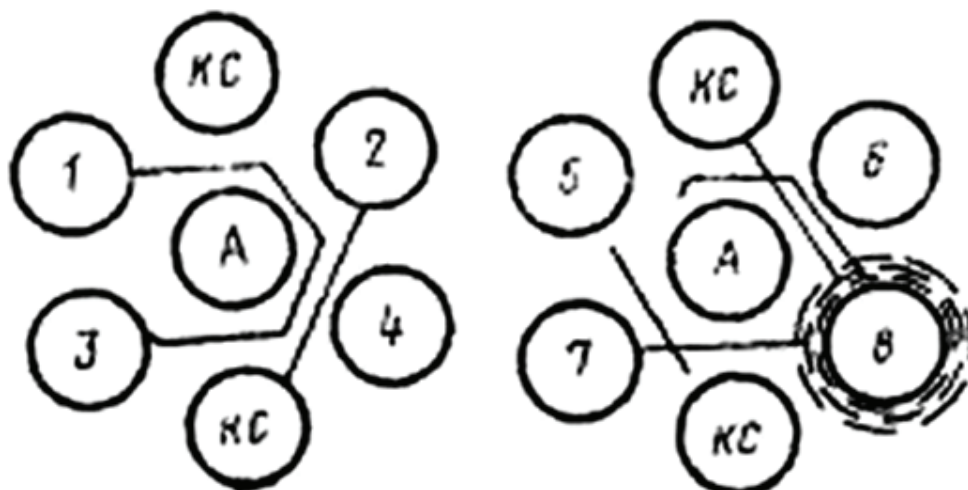
Вопросы для закрепления

1. Система компонента. Пути активации.
2. Контроль качества РИД. Критерии надежности метода.
3. Постановка РИД для определения СЗ, контрольные материалы.

Студент _____ Преподаватель _____

Приложение к занятию №7

Схема постановки и оценки реакции иммунодиффузии в геле агара (РИД)



1 – отрицательно реагирующая сыворотка, 2 – положительно реагирующая сыворотка, 3 – слабоположительная реагирующая сыворотка, 4 – положительно реагирующая сыворотка со второй линией преципитации, 5 – резко положительно реагирующая сыворотка, 6 – положительно реагирующая сыворотка с неспецифической линией преципитации, 7 – отрицательно реагирующая сыворотка с неспецифической линией преципитации, 8 – отрицательно реагирующая сыворотка с зоной опалесценции, А – антиген онкорнавируса у КРС, КС – контрольная сыворотка против гликопротеидного антигена онкорнавируса КРС.





Серологический метод диагностики основан на выявлении в сыворотке крови животных с помощью РИД антител к антигену ВЛКРС.



Используемая литература

Основные источники (для студентов)

1. Микробиология: учебник / Под ред. Зверева В.В.. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 384 с.
2. Беляев С.А. Микробиология: Учебное пособие / С.А. Беляев. – СПб.: Лань П, 2016. – 496 с.
3. Белясова Н.А. Микробиология: Учебник / Н.А. Белясова. – Мн.: Вышэйшая шк., 2012. – 443 с.
4. Белясова Н.А. Микробиология / Н.А. Белясова. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 442 с.
5. Блинов Л.Н. Санитарная микробиология: Учебное пособие КПТ / Л.Н. Блинов, М.С. Гутенев, И.Л. Перфилова и др. – СПб.: Лань КПТ, 2016. – 240 с.
6. Блинов Л.Н. Микробиология и иммунология: Учебное пособие / Л.Н. Блинов, И.Л. Перфилова и др. – СПб.: Лань, 2013. – 240 с.
7. Борзова Л.Д. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум: Учебное пособие / Л.Д. Борзова, Н.Ю. Черникова, В.В. Якушев и др. – СПб.: Лань, 2016. – 368 с.
8. Бородин А.Н. Ветеринарная микробиология и микология: Учебник / А.Н. Бородин. – СПб.: Лань, 2014. – 624 с.
9. Эпизоотология с микробиологией [Электронный ресурс]: учеб. / А.С. Алиев [и др.]. – Электрон. дан. – Санкт-Петербург: Лань, 2017. – 432 с. – Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/90154>
Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/5857>

Дополнительные источники (для студентов)

1. Госманов Р.Г. Микробиология и иммунология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. – СПб.: Лань, 2013. – 240 с.
2. Госманов Р.Г. Санитарная микробиология пищевых продуктов: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев и др. – СПб.: Лань, 2015. – 560 с.
3. Госманов Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков и др. – СПб.: Лань, 2011. – 496 с.
4. Госманов Р.Г. Санитарная микробиология пищевых продуктов: Учебное пособие / Р.Г. Госманов Н.М. Колычев. – СПб.: Лань, 2015. – 560 с.
5. Госманов Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин и др. – СПб.: Лань, 2019. – 496 с.
6. Госманов Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков. – СПб.: Лань, 2011. – 496 с.
7. Госманов Р.Г. Микробиология / Р.Г. Госманов и др. – СПб.: Лань, 2011. – 496 с.

**«Микробиология»
Рабочая тетрадь**

*Разработала
Бунина Татьяна Сергеевна
специалист Управления ветеринарии
по Тамбовской области*

Дизайн и компьютерная верстка – Д. Болкова
Корректор – Е. Бусина

АО «Издательский дом «Мичуринск»
Формат 60x84 1/8. Печать цифровая.
Тир. 12 экз. Зак. № 3529

