

**Тема:**

**Виготовлення препаратів-мазків, препаратів-відбитків із культур мікроорганізмів та досліджваного матеріалу.**

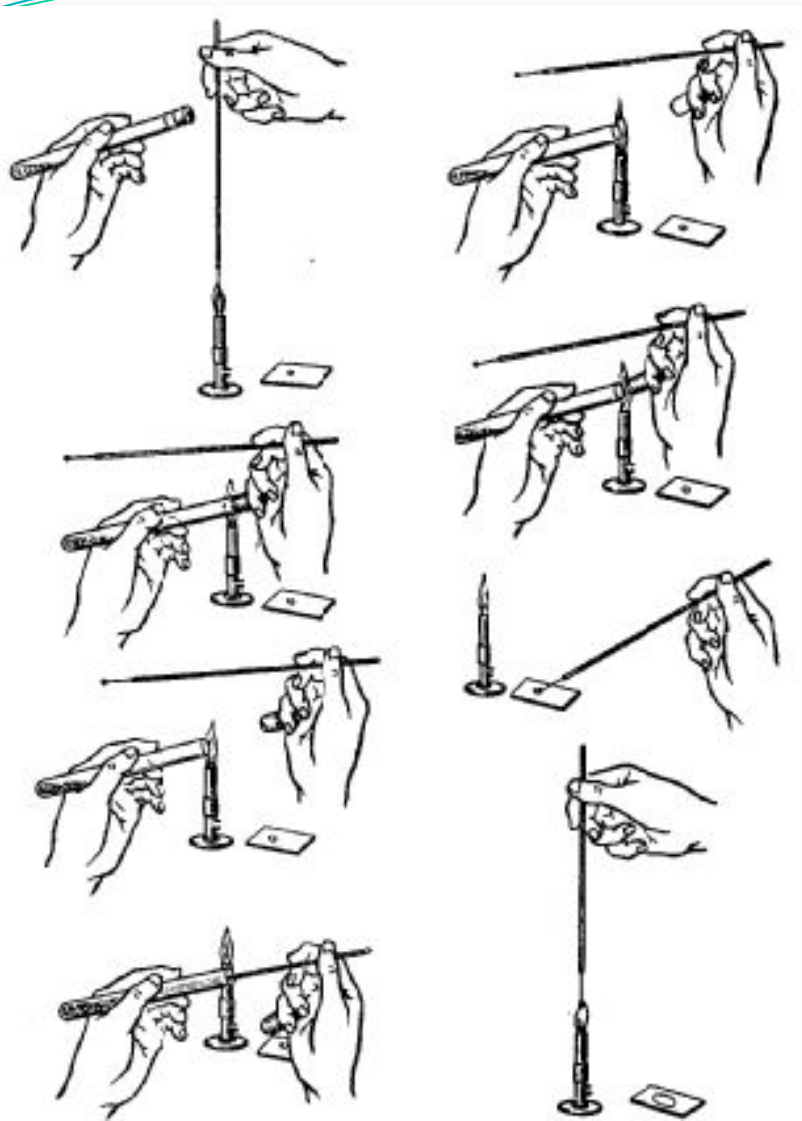
**Приготування барвників, прості методи фарбування.**

Для мікроскопічного дослідження виготовляють препарати на предметному склі, дотримуючись правил асептики. З культур мікроорганізмів, вирощених на щільних та рідких живильних середовищах, молоці, крові та гною з допомогою бактеріальної петлі або пастерівської піпетки готують препарати-мазки, а з уражених тканин та органів (печінка, селезінка, лімфатичні вузли тощо) – препарати-відбитки. Бактеріологічна петля на кінці має заокруглення діаметром у 1,5–3 мм і виготовляється з матеріалу, що швидко розжарюється (червоніє) і швидко вистигає (краще проволока з платини або спіраль з електроплитки). Пастерівські піпетки одноразові, готують із легкоплавкого скла, витягуючи у капіляр, загортають у пергаментний папір і стерилізують автоклавуванням.

Предметні скельця для виготовлення препаратів повинні бути чистими і знежиреними, про що свідчить рівномірний розподіл води на їх поверхні. Тому нові скельця перед використанням кип'ятять впродовж 10 хв. у 1% розчині гідрокарбонату натрію, промивають у дистильованій воді з 0,5 % соляної кислоти, споліскують у дистильованій воді і висушують у сушильній шафі. При повторному використанні скельця обробляють розчином хромпіку (5% двохромовоокислий калій у сірчаній кислоті) 1-2 год., промивають в проточній воді і кип'ятять у 5% розчині соди 30 хв., споліскують у дистильованій воді і висушують. Скельця зберігають у скляних банках з притертою пробкою у суміші етилового спирту та ефіру порівну.

При *виготовленні препаратів-мазків* з культури, вирощеної у рідкому живильному середовищі, пробірку беруть у ліву руку, легенько струшують і розміщують її між вказівним та середнім пальцем, притримуючи зверху

- У праву руку беруть бактеріологічну петлю, обпалюють її у полум'ї пальника до почервоніння, мізинцем цієї ж руки біля полум'я виймають пробку з пробірки і вводять у пробірку петлю, заокруглений кінець якої занурюють у рідину. Краплю рідини з культурою переносять на середину поверхні скла і рівномірно розподіляють тонким шаром на площі у 4 см<sup>2</sup>. Потім, залишки культури на петлі спалюють у полум'ї пальника (можна використовувати пастерівські піпетки). Якщо мазки виготовляють із культур, вирощених на щільному середовищі, то спочатку на скло наносять краплю стерильного фізрозчину або дистильованої води, яку вносять невелику кількість мікробної маси, знятої петлею з поверхні культури, перемішують і розподіляють тонким шаром.



**Виготовлення препарата-мазка**

- Виготовлені препарати *висушують* на повітрі при кімнатній температурі або в теплому повітрі над полум'ям пальника на висоті 20 см. Після цього їх *фіксують*, проводячи 3–4 рази над полум'ям пальника (тримаючи мазком угору) і торкаючись кожного разу шкіри руки. Якщо при цьому відчуваються ознаки припікання, то вважають, що мазок зафіксований. Можна використовувати і хімічні методи фіксації: етиловим спиртом (96%) – 10–15 хв., ацетоном – 5, метанолом – 2–3 хв., парами формаліну. Фіксація препаратів проводиться з метою прикріплення мікроба до скла, знешкодження його і сприяє кращому проникненню фарб в оболонку.

● **Головні барвники.** Для фарбування бактеріальних клітин використовують частіше основні та нейтральні анілінові фарби: фіолетові (генціанвіолет, кристалвіолет, метилвіолет), червоні (основний фуксин, сафранін), зелені (малахітовий або брильянтовий зелений) та сині (метиленовий синій). З деяких фарб спочатку готують насичені спиртові розчини, з яких потім отримують робочі розчини, з інших – водні розчини. Найбільш часто використовують карболовий розчин генціанвіолету, карболовий розчин фуксину (фуксин Ціля) та його робочий розчин (фуксину Пфейффера), лужний розчин метиленового синього (за Леффлером), водні розчини – 2 % сафраніну, 1 % малахітової зелені та фарбу Романовського-Гімзи.

● **Карболовий фуксин Ціля.** 1 г основного фуксину розтирають у ступці з 5 г кристалічного фенолу та кількома краплями гліцерину і поступово додають 10 см<sup>3</sup> спирту-ректифікату. Коли фарба стає сиропоподібної консистенції, в неї додають 100 см<sup>3</sup> дистильованої води при постійному перемішуванні, після чого розчин фільтрують. Фарба дуже стійка і може довго зберігатись. З неї можна готувати робочий розчин (фуксин Пфейффера), для чого карболовий фуксин Ціля розводять дистильованою водою 1:10. Цей розчин нестійкий і тому готується перед використанням.

*Карболовий генціанвіолет.* 1 г сухої фарби, 2 г кристалічного фенолу змішують з 10 мл спирту та кількома краплями гліцерину, розтирають у ступці і змішують з 100 см<sup>3</sup> дистильованої води. Розчин витримують 1-2 доби в термостаті і фільтрують через паперовий фільтр. Щоб запобігти утворенню осаду на мазках, фарбують ним через фільтрувальний папір.

*Лужний розчин метиленового синього (синька за Леффлером).* 3 г фарби заливають 100 см<sup>3</sup> спирту-ректифікату і витримують 3-4 місяці. До 30 см<sup>3</sup> отриманого насиченого розчину додають 100 см<sup>3</sup> дистильованої води, та 1 см<sup>3</sup> 1% розчину КОН і фільтрують.

*Водний розчин 2 % сафраніну.* 2 г фарби заливають 100 см<sup>3</sup> гарячої дистильованої води, розчин фільтрують через паперовий фільтр.

*1 % розчин малахітової або брильянтової зелені.* 1 г фарби змішують з 100 см<sup>3</sup> гарячої дистильованої води, фільтрують.

*Розчин фарби Романовського-Гімзи* продається в готовому вигляді. До складу її входять азур та еозин. Перед використанням фарбу розводять дистильованою



*Прості методи фарбування.* У простих методах використовують одну фарбу внаслідок чого бактерії забарвлюються в один колір. Вони дозволяють виявити форму мікроорганізму, інколи – зернистість; іноді може спостерігатись явище метахромазії (розщеплення кольору). Для цього фіксований мазок кладуть на "місток" над зливною чашкою і наносять розчин однієї фарби: карболовий генціанвіолет (обов'язково через смужку фільтрувального паперу), робочий розчин фуксину, або розчин сафраніну на 1-2 хв, а лужний розчин метиленової синьки – на 3-5 хв. Потім фарбу зливають, промивають водою, висушують і оглядають під імерсійною системою.

• **Дякую за увагу!**

