

Млинівський державний технолого-економічний коледж

Інструкційна картка Лабораторне заняття № 4

Дисципліна: Внутрішні незаразні хвороби с/г тварин.

Вид заняття: лабораторне заняття.

Тема: Виготовлення і забарвлення мазків крові. Виведення лейкограми. Порівняння результатів дослідження у різних видів тварин.

Мета заняття: Освоїти методику виготовлення і забарвлення мазків крові методом Романовського-Гімза; методику виведення лейкоцитарної формули. Навчити порівнювати результати дослідження у різних видів тварин.

Методи: бесіда, демонстрація, презентація, дослідження крові під керівництвом викладача, самостійна робота.

Матеріально-технічне забезпечення та дидактичні засоби, ТЗН: штативи з пробірками з кров'ю, піпетки, кювети, мікроскопи з предметними столиками, предметні, шліфовані скельця, реактиви (фарба Романовського-Гімза, дистильована вода), спирт, вата, мило, рукавички, рушники; комп'ютер, проектор, презентація.

Література (основна та додаткова):

1. Судаков М.О., Береза В.І. та ін. Внутрішні незаразні хвороби с/г тварин: Практикум. – К.: Вища школа, 1995. – 206 с.

(сто. 93–101)

2. Судаков М.О., Цвіліховський М.І., Береза В.І. та ін. Внутрішні незаразні хвороби с/г тварин / За ред. М.О. Судакова. – К.: Мета, 2002. – 352 с.

(стор. 93–97)

3. Левченко В.І., Судаков М.О., Мельник Й.Л. та ін. Клінічна діагностика хвороб тварин / За ред. В.І. Левченка. – К.: Урожай, 1995. – 368 с.

(стор. 260–281)

Робочий зошит. Лабораторне заняття № 4.

Інструктаж на робочому місці.

Самостійна робота

Зміст, послідовність виконання завдань.

Завдання 1. Виготовити і зафарбувати мазки крові методом Романовського-Гімза (описати методику виготовлення).

Методичні вказівки

Мазки крові виготовляють на чистих знежирених предметних стеклах. Нові, які ще не були у вжитку, стекла очищають від пилу в холодній воді, потім протирають щіткою в теплій воді і промивають 2-3 год. у проточній воді.

Стекла, які були у вжитку, після зняття з них імерсійної олії шматочком змоченої в бензині вати, очищають у теплій мильній воді, потім витримують протягом кількох днів у хромовій суміші (1 л гарячої води, 100 г дихромату калію, 100 мл концентрованої сірчаної кислоти), після чого прополіскують у проточній воді.

Мокрі стекла витирають чистою сухою ганчіркою і кладуть у широкогорлу банку з сумішшю спирту й ефіру (в рівних частинах) та закривають притертою пробкою. Перед використанням стекла пінцетом виймають з банки, протирають

чистим м'яким полотняним матеріалом, не торкаючись при цьому поверхні скла пальцями.

Краплю крові для мазки беруть з вен вуха. Місце-уколу вистригають, очищають спиртом і ефіром. Першу краплю крові (за винятком при дослідженні на піроплазмідози) витирають ватним тампоном, а до наступної злегка торкаються поверхнею предметного скла, яке тримають за короткі ребра великим і вказівним пальцями лівої руки; краплю наносять ближче до одного з кінців скла так, щоб вона була посередині від його довгих країв. Перевернувши предметне скло краплею догори, до неї підводять відшліфоване предметне скло під кутом 45°. В момент дотикання скла з краплею через капілярність кров швидко розпливається по шліфованому краю скла вздовж лінії утвореного кута. Після цього легким натиском відшліфоване скло швидко без зупинок пересувають на протилежний кінець предметного скла так, щоб кров безперервно тягнулась за його краєм, розміщуючись тонким шаром на предметному склі. При цьому пучки пальців повинні злегка торкатись довгих ребер предметного скла. Величина краплі крові повинна бути такою, щоб тонкий шар її закінчувався, не доходячи до кінця предметного скла.

Виготовлений мазок висушують на повітрі. Підписують дату виготовлення і кличку тварини на щільнішому краї мазка простим олівцем з загостреним кінцем або голкою.

При потребі можна використовувати цитратну кров, взяту з яремної вени.

Влітку мазки крові слід оберігати від мух. Для цього їх кладуть на сірники шаром крові донизу. Взимку мазки слід оберігати від гемолізу. При виготовленні мазків у холодному і вологому приміщенні їх можна висушувати на теплій руці, а якщо мазки роблять при температурі мінус 10–15 °С, то для запобігання гемолізу їх потрібно зразу опустити в кювету з метиловим спиртом і в такому стані внести в тепле приміщення. При зберіганні мазки слід оберігати також від дії парів кислот, лугів, диму та різних газів.

Правильний мазок повинен відповідати таким вимогам: бути рівним, без пустот та розривів і займати не менш як 2/3 довжини скла; бути не щільним (щоб через нього можна було читати газетний шрифт) і відливати кольорами райдуги; закінчуватись бахромкою або поступово сходити нанівець; бути вужчим за предметне скло.

Висушені мазки потрібно зафіксувати. Кращим фіксатором є метиловий спирт, в якому їх витримують протягом 3–5 хв. Можна використовувати й інші фіксатори: абсолютний етиловий спирт, в якому мазки витримують 15–20 хв, суміш рівних частин спирту й ефіру – 15–20 хв, ацетон – 5 хв. Фіксацію потрібно проводити в закритому посуді. Вийняті пінцетом з фіксатора мазки висушують на повітрі і фарбують барвниками, розведеними дистильованою водою, яка повинна мати нейтральну реакцію.

Найпоширенішим методом фарбування мазків крові є *метод Романовського-Гімзи*. Перед фарбуванням основний розчин фарби (азур II, еозин, гліцерин, метиловий спирт) розводять дистильованою водою нейтральної реакції з розрахунку на 1 мл води 2–3 краплі фарби.

Зафіксований мазок кладуть на сірники (без головок) у чашку Петрі мазком крові вниз і під мазок обережно наливають свіжо виготовлений робочий розчин фарби, стежачи, щоб під мазком не утворились пухирці повітря. Залежно від температури оточуючого повітря мазки фарбують протягом 20–35 хв; для фарбування мазків у суху жарку погоду потрібно менше часу, ніж у сиру і холодну. Після фарбування мазок промивають дистильованою водою і висушують на повітрі.

Завдання 2. Визначити лейкоцитарну формулу.

Методичні вказівки.

Морфологічний склад лейкоцитів визначають за допомогою лейкограми, яка показує процентне співвідношення окремих видів клітин білої крові.

Щоб вивести лейкограму, у пофарбованому мазку крові підраховують 100 або 200 лейкоцитів (чим більше клітин, тим точніший результат), диференціюючи різні види лейкоцитів і підраховуючи їх процентне співвідношення.

Підраховувати лейкоцити можна різними способами, але найзручнішим і найточнішим є *спосіб Філіпченка*, який враховує те, що лейкоцити різних видів розподіляються в мазку нерівномірно. Нейтрофіли частіше знаходяться на периферії, а лімфоцити – у центрі мазка. При підрахунку лейкоцитів мазок умовно ділять на три частини: початкову, середню та кінцеву. В кожній частині лейкоцити підраховують за П - подібними лініями, що йдуть уперек мазка від одного краю до другого. У всіх трьох частинах нараховують 100 або 200 клітин.

Лейкограма здорових тварин

Вид тварин	Базофіли, %	Еозинофіли, %	Нейтрофіли, %			Лімфоцити, %	Моноцити, %
			юні	паличко-ядерні	сегментоядерні		
ВРХ	0,75	6,5	–	6,5	20	59,25	7
	0–1,5	3–10	–	3–10	10–30	40–77	4–10
Коні	0,6	4	–	1,2	50	39	3
	0,1–1,2	2,6–6,2	–	0,9–1,5	40,1–55,1	29,9–50,6	0,1–4,0
Кози	0,8	3	–	1,4	41	50	4
	0–2	2–7,5	–	0,5–4,0	28,7–56,7	32–68	2,5–6
Свині	1,2	3	2,1	4	39	47	2,1
	0–2,4	0–6	0–4,1	1–7	18–60	29–65	0–4,2
Собаки	1	6	–	3	60	25	7
	0,4–1,6	3–9	–	0–6	45–75	10–40	4–10
Кури	3,2	15,2	–	0,5	23,5	58	6
	1,5–5	4–26,5	–	0–1	14–33	34–83	3–9,5

Під час аналізу лейкограми особливу увагу звертають на нейтрофіли, або спеціальні лейкоцити. Так, збільшення вмісту молодих нейтрофілів (мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних) часто супроводжується зменшенням вмісту зрілих (сегментоядерних) нейтрофілів. Це є ознакою підвищення регенеративної здатності кісткового мозку та лейкопоезу. Таку зміну лейкограми називають регенеративним зрушенням ядра нейтрофілів, або зрушенням вліво. Назва «зрушення вліво» стає зрозумілою, якщо згадати порядок запису лейкограми, яку запропонував Арнет.

Порядок запису лейкоцитарної формули

Б	Е	Нейтрофіли				Л	Мон.	Кл. Т	Г
		М	Ю	П	С				

При регенеративному зрушенні ядра нейтрофілів (зрушення вліво) загальна кількість нейтрофілів збільшується. При цьому розрізняють:

1) просте регенеративне зрушення ядра, коли відбувається збільшення вмісту переважно паличкоядерних нейтрофілів і утворюється не більш як 1–2 % нейтрофільних метамієлоцитів (юних нейтрофілів); мієлоцитів немає;

2) гіперрегенеративне зрушення ядра, коли вміст паличкоядерних нейтрофілів значно збільшується і з'являється багато нейтрофільних метамієлоцитів і мієлоцитів ;

3) лейкомоїдне зрушення ядра характеризується появою в периферичній крові незрілих клітин – нейтрофільних мієлоцитів, промієлоцитів і мієлобластів. На відміну від лейкоемічної форми лейкозу (гемобласту), загальна кількість лейкоцитів збільшується в меншій мірі, а поява незрілих лейкоцитів буває порівняно короткочасною.

Лейкограма дає також уявлення про дегенеративні зміни крові і пригнічення лейкопоезу. У цих випадках аналіз лейкограми показує дегенеративне зрушення ядра нейтрофілів (зрушення вправо), яке характеризується зменшенням вмісту молодих і збільшенням вмісту зрілих і старих нейтрофілів. При цьому загальна кількість нейтрофілів, на відміну від зрушення вліво, зменшена внаслідок загибелі їх під дією отрут, токсинів, продуктів запалення, а також внаслідок пригнічення лейкопоезу.

Лейкограма, поряд з визначенням загальної кількості лейкоцитів в 1 мкл крові, виявляє видові лейкоцитози: нейтрофільний, еозинофільний, базофільний лейкоцитози, а також лімфоцитоз і моноцитоз.

Нейтрофільний лейкоцитоз (нейтрофілія, нейтрофіліоз) спостерігається при багатьох гострих інфекційних захворюваннях, запальних процесах (особливо гнійних), при інтоксикаціях, злоякісних новоутвореннях і стресах.

Еозинофільний лейкоцитоз (еозинофілія) найчастіше буває при алергіях, які дуже часто виникають у тварин при гельмінтозах, а також при опіках, шкірних захворюваннях, бешисі свиней, бронхіальній астмі.

Базофільний лейкоцитоз (базофілія) частіше виявляється поряд з еозинофілією, а також при голодуванні, гемофілії.

Лімфоцитоз є ознакою хронічних інфекційних захворювань, особливо туберкульозу, сапу, а також чуми свиней, лімфолейкозу, стадії видужання після гострих інфекційних захворювань.

Моноцитоз найчастіше буває при кровопаразитарних захворюваннях (піроплазмідозах), інфекційній анемії коней, септичних процесах в організмі.

З метою точнішого аналізу лейкограми і точнішого виявлення видових лейкоцитозів у тварин виводять лейкоцитарний і гематологічний профілі.

Лейкограма показує, як уже зазначалося, процентний вміст і відносну кількість різних лейкоцитів, а лейкоцитарний профіль – абсолютну кількість їх, що точніше характеризує зрушення в лейкопоезі й організмі тварини.

Для виведення лейкоцитарного профілю потрібно визначити загальну кількість лейкоцитів в 1 мкл крові і вивести лейкограму, після чого обчислити абсолютний вміст у цій одиниці об'єму крові різних лейкоцитів і визначити їх співвідношення.

Висновок.

Після виконання завдань студенти повинні

Знати: Методику виготовлення і забарвлення мазків крові методом Романовського-Гімза; методику виведення лейкоцитарної формули.

Вміти: Виготовляти і забарвлювати мазки крові методом Романовського-Гімза; визначати лейкоцитарну формулу; порівнювати результати дослідження у різних видів тварин.

Заключний інструктаж і завдання додому

1. Оформлення звіту лабораторної роботи в зошиті.
2. Прибирання робочих місць.
Л. 1. С. 98-101.
Л. 2. С. 93-98.
Л. 3. С. 260-281.