



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



BIOTEHNIŠKI
IZOBRAŽEVALNI
CENTER LJUBLJANA



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

Laboratorijsko delo v veterini 2

Priročnik za laboratorijske vaje za veterinarske tehnike

Bianka Mertelj



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



BIOTEHNIŠKI
IZOBRAŽEVALNI
CENTER LJUBLJANA



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

Naslov: Laboratorijsko delo v veterini 2

Izobraževalni program: Veterinarski tehnik

Modul: Laboratorijsko delo v veterini

Avtor: Bianka Mertelj, dr. vet. med.

Strokovni recenzent: Emil Grah, dr. vet. med.

Lektorica: Marjana Mastinšek-Šuštar, prof. slov.

Založnik: Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

CIP – Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

636.09:616-074(075.3)(076.5)

MERTELJ, Bianka

Laboratorijsko delo v veterini 2 [Elektronski vir] : priročnik za laboratorijske vaje za veterinarske tehnike / Bianka Mertelj. – El. knjiga. – Ljubljana : Biotehniški izobraževalni center, 2011. – (Izobraževalni program Veterinarski tehnik. Modul Laboratorijsko delo v veterini)

Način dostopa (URL): <http://www.konzorcij-bss.bc-naklo.si/>. – Projekt Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj

ISBN 978-961-93116-2-2 (pdf)

257870080

Ljubljana, 2011

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj (2008-2012).

Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, razvojne prioritete: Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja, prednostna usmeritev Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

KAZALO:

KOPROLOŠKE PREISKAVE.....	6
NATIVNI PREPARAT	6
METODA FLOTACIJE	7
METODA SEDIMENTACIJE.....	8
METODA PO VAJDI	8
METODA PO BAERMANU	9
KOPROKULTURA	10
DIAGNOSTIKA ZUNANJIH ZAJEDALCEV (GARJAVCEV).....	11
DIAGNOSTIKA UŠESNIH GARIJ	11
DIAGNOSTIKA <i>Cheyletiellae</i> – “SPREHAJAJOČEGA SE PRHLJAJA”	11
DIAGNOSTIKA KOŽNIH GARJAVCEV	12
URINSKE PREISKAVE.....	13
FIZIKALNE PREISKAVE URINA.....	13
PRIPRAVA URINSKEGA SEDIMENTA	14
HITRI KOMERCIALNI TESTI.....	15
BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA URINA	17
PREISKAVA PO SANFORDU	17
PREGLED URINA NA BELJAKOVINE	18
PREIZKUS S SULFOSALICILNO KISLINO	18
HELLERJEV PREIZKUS S KONCENTRIRANO SOLITRNO KISLINO.....	19
PREIZKUS S KUHANJEM.....	20
PREIZKUS PO ESBACHU	20
UGOTAVLJANJE SPECIFIČNE TEŽE URINA.....	21
KRVNE PREISKAVE	22
PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA	22
BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA PO METODI MAY-GRUNWALD-GIEMSA.....	23
BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA Z DIFF-QUICKOVIMI BARVILI.....	24

MIKROSKOPIRANJE KRVNIH RAZMAZOV	25
DOLOČANJE ŠTEVILA KRVNIH CELIC	27
DOLOČANJE SEDIMENTACIJE KRVI PO WESTERGREENU.....	29
DOLOČANJE VREDNOSTI HEMATOKRITA.....	30
DOLOČANJE ČASA KOAGULACIJE KRVI	31
PREISKAVE MLEKA.....	32
UGOTAVLJANJE ZAVIRALNIH SNOVI.....	32
UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V MLEKU.....	33
UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ V VZORCU MLEKA – MASTITIS	34
ODVZEM VZORCA MLEKA	34
PREISKAVE SEMENA.....	36
STOPNJE POŠKODOVANOSTI SEMENČIC	36
ŠTETJE SEMENČIC	37
PREISKAVA BRISA MATERNIČNEGA VRATU	39
PREISKAVA BRISA SLUHOVODA.....	40
PRIPRAVA CITOLOŠKIH PREPARATOV	41
ODVZEM VZORCA IN VIVO	41
ODVZEM VZORCA IN VITRO	44
BARVANJE CITOLOŠKIH PREPARATOV	45
TEHNIKE PRIPRAVE CITOLOŠKIH VZORCEV.....	47
ENOSTAVEN RAZMAZ	47
LINEARNI (ČRTNI) RAZMAZ.....	48
DEBELOPLASTNI RAZMAZ.....	49
PRIPRAVA RAZMAZOV IZ CENTRIFUGIRANIH VZORCEV	50
ZVEZDASTO RAZMAZOVANJE	51
PRIPRAVA PREPARATOV IZ BRISA.....	51
PRIPRAVA PREPARATA STISNJENCA	52
PRIPRAVA PREPARATA – ODTIS	53

PRIPRAVA MIKROSKOPSKEGA PREPARATA – OSTRUŽEK	53
PRIPRAVA MIKROSKOPSKEGA PREPARATA – RETIKULOCITI.....	54
SHRANJEVANJE IN POŠILJANJE CITOLOŠKIH PREPARATOV	56
LITERATURA.....	57

KOPROLOŠKE PREISKAVE

Koprološke preiskave so najštevilnejše preiskave v veterini in tudi zaradi velikega gospodarskega pomena v živinoreji terjajo natančnost. Z njimi iščemo jajčeca različnih zajedavcev oz. njihove invazijske ličinke.

Za koprološko preiskavo iztrebkov, ko iščemo jajčeca zajedavcev, naj bi bili iztrebki čim bolj sveži, medtem ko za preiskavo na invazijske ličinke to ni potrebno. Količina, ki jo potrebujemo, je odvisna od števila preiskav. Za osnovne preiskave naj bi zadostovala za večji oreh velika količina iztrebkov.

Pri koproloških preiskavah izkoriščamo različne lastnosti jajčec in ličink. Za odkrivanje jajčec najpogosteje izkoriščamo njihovo specifično težo. Glede na specifično težo jajčec in medija, v katerem se nahajajo, jajčeca splavajo na površino ali potonejo na dno. Pri ličinkah izkoriščamo učinek tople vode, zaradi česa ličinke zapustijo iztrebke in jih tako lažje dokažemo.

Pri koproloških preiskavah moramo imeti stalno v mislih, da delamo s kužnim materialom. V iztrebkih niso samo zajedavci, temveč veliko število mikroorganizmov. Čeprav za odkrivanje zajedavcev ni nujno aseptično delo, ker sama kontaminacija vzorca ne vpliva negativno na rezultat, se moramo držati osnovnih načel asepse med samim delom in moramo poskrbeti, da po opravljenem delu material neškodljivo uničimo, pribor in delovne površine pa razkužimo oz. steriliziramo.

NATIVNI PREPARAT

Preiskava je primerna le, ko je v iztrebkih veliko zajedavskih jajčec ali oocist.

Material in inventar: 100 mL čaša, steklena paličica, predmetno in krovno stekelce, mikroskop.

NALOGA

1. Košček iztrebkov, velikosti oreha, razredčite v čaši z dva- do trikratno količino vode.
2. Kapljico te zmesi kanite s stekleno paličico na predmetno stekelce in pokrijte s krovnim stekelcem.
3. Preparat preglejte z mikroskopom pod 100-kratno povečavo.

Izpeljite postopek in narišite najdena jajčeca ter jih določite s pomočjo atlasa ali skice v učbeniku.

METODA FLOTACIJE

Pri tej koprološki preiskavi izkoriščamo to, da jajčeca z manjšo specifično težo v nasičeni raztopini kuhinjske soli ali sladkorja priplavajo na površino.

Priprava nasičene raztopine kuhinjske soli

Sol raztopite v vreli vodi, in sicer dodajajte tolikšno količino, da se sol še topi. Ko se voda ohladi, mora ostati na dnu nekaj kristalov soli.

Material in inventar: vzorec iztrebkov, 100 mL čaša, nasičena raztopina kuhinjske soli, steklena paličica, gosto sito, kapalka, dve epruveti, predmetni in krovni stekelci, bakteriološka zanka, mikroskop.

NALOGA

1. Za lešnik velik košček iztrebkov razredčite v kozarcu z dva- do trikratno količino raztopine kuhinjske soli.
2. Zmes dobro premešajte in skozi gosto sito precedite v dve epruveti do roba epruвет.
3. S kapalko dodajte nasičeno raztopino soli tako, da na vrhu epruvete nastane kupola.
4. Na vrh ene epruvete položite krovno stekelce.
5. Po dvajsetih minutah odstranite krovno stekelce in ga postavite pod kotom 45° na predmetno stekelce.

6. Po dvajsetih minutah z druge epruvete z bakteriološko zanko zajemite vsebino vrha kupole in jo prenesite na sredino predmetnega stekelca. Tekočino pokrijte s krovnim stekelcem tako, da ga pod kotom 45° počasi spustite.
7. Oba preparata pregledajte pod 100-kratno povečavo.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in narišite najdena jajčeca ter jih določite.

METODA SEDIMENTACIJE

Ta metoda temelji na sesedanju jajčec večje specifične teže v običajni vodi. Razen jajčec zajedavcev sedimentirajo tudi neprebavljeni delci hrane in rastlinskega semena.

Material in inventar: vzorec iztrebkov, 100 mL čaša, navadna ali destilirana voda, steklena paličica, stekleni valj, petrijevka, mikroskop.

NALOGA

1. V kozarcu zmešajte za oreh veliko količino iztrebkov z navadno ali destilirano vodo.
2. Vsebino precedite skozi gosto sito v stekleni valj.
3. Nato dolijte vodo do zgornjega roba steklenega valja in zmes pustite stati 15 minut.
4. Dve tretjini tekočine previdno odlijte in stekleni valj znova napolnite z vodo.
5. Čez 10 minut odlijte tekočino, sediment pa pretočite v petrijevko in ga mikroskopsko pregledajte.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in narišite najdena jajčeca ter jih določite.

METODA PO VAJDI

Metodo po Vajdi uporabljamo za dokazovanje in določanje ličink v iztrebkih domačih živali. Izkoriščamo termotropizem; to je, da ličinke iz hladnejšega okolja preidejo v toplejše.

Material in inventar: vzorec iztrebkov, petrijevka, čaša s toplo vodo (37 °C), pinceta, mikroskop.

NALOGA

1. Na sredo petrijevke položite za oreh velik kos iztrebka.
2. Polijte ga s toplo vodo tako, da je skoraj pokrit.
3. Po desetih minutah s pinceto odstranite iztrebek.
4. Previdno odlijte odvečno tekočino v pokrov petrijevke in pregledajte pod 40- in 100-kratno povečavo.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in narišite najdene ličinke ter jih določite.

METODA PO BAERMANU

Metodo po Baermanu prav tako uporabljamo za dokazovanje in določanje ličink v iztrebkih domačih živali. Tudi tukaj izkoriščamo termotropizem. Ta metoda je v bistvu bolj izpopolnjena in zanesljivejša kot metoda po Vajdi.

Material in inventar: vzorec iztrebkov, petrijevka, čaša s toplo vodo (37 °C), stojalo za lij, lij, gumijasta cev s zapiralom, kovinska mrežica ali gaza, mikroskop.

NALOGA

1. Postavite stojalo z lijem na mizo.
2. Za oreh veliko količino iztrebka zavijte v gazo ali položite na mrežico in postavite v lij.
3. Prelijte iztrebek s toplo vodo.
4. Po dvajsetih minutah spustite majhno količino tekočine v petrijevko.
5. Poiščite ličinke pod mikroskopom pod 40- in 100-kratno povečavo.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in narišite najdene ličinke ter jih določite.

V šoli zaradi pomanjkanja časa izpeljemo nalogo na opisan način, v praksi pa pustimo iztrebke v topli vodi za 24 ur.

KOPROKULTURA

Včasih je težko določiti vrsto zajedavca na podlagi jajčeca. Zato pustimo, da se iz jajčec na invazijski stopnji sprostijo ličinke po določenem času inkubacije in jih nato določimo.

Material in inventar: vzorec iztrebkov, petrijevka, fiziološka raztopina, filter papir, inkubator, pinceta, mikroskop, alufolija.

NALOGA

1. Na dno petrijevke položite filter papir in ga prelijte s fiziološko raztopino.
2. Na sredino filter papirja položite za lešnik velik kos iztrebka.
3. Petrijevko zaprite in zavijte v alufolijo.
4. Tako pripravljeno petrijevko postavite v inkubator na 25 °C.
5. Po desetih dneh previdno odlijte tekočino v pokrov druge petrijevke in pregledajte pod 40- in 100-kratno povečavo.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in narišite najdene ličinke ter jih določite.

DIAGNOSTIKA ZUNANJIH ZAJEDALCEV (GARJAVCEV)

Pri zunanjih zajedavcih je le diagnostika na garjavce nekoliko zahtevnejša, zato se bomo posvetili le tej.

Poznamo več vrst garjavcev, ki zajedajo v ali na koži, v dlačnih mešičkih in zunanjem sluhovodu (odvisno od vrste). Problem predstavljajo pri psih, mačkah in kuncih. Diagnostika je enostavna, saj že pod dobro lupo ali 40-kratno povečavo mikroskopa lahko opazimo odrasle garjavce ali ličinke. Ločimo jih po velikosti in številu nog. Odrasli garjavci imajo štiri pare nog, ličinke pa tri.

DIAGNOSTIKA UŠESNIH GARIJ

V zunanjem sluhovodu psov, mačk in kuncev zajedajo garjavci iz rodu *Otodectes*.

Material in inventar: vatirana palčka, mineralno olje, predmetno stekelce, mikroskop.

NALOGA

1. Z vatirano palčko, namočeno v mineralno olje, podrgnite po spodnjem delu zunanjega sluhovoda (poskušajte zajeti temni drobir).
2. Dobljeni material razmažite po predmetnem stekelcu.
3. Poiščite sliko pod 40-kratno povečavo.
4. Najdene garjavce narišite in identificirajte.

DIAGNOSTIKA *Cheyletiellae* – “SPREHAJAJOČEGA SE PRHLJAJA”

Na površini kože hišnih ljubljencev, predvsem mladičkov, lahko zajedajo garjavci iz družine *Cheyletiella*. Pri živalih opazimo prhljaj na koži, srbečico, izpadanje in slabšo kakovost dlake. Diagnostika je zelo enostavna.

Material in inventar: samolepilni trak, predmetno stekelce, mikroskop.

NALOGA

1. Samolepilni trak pritisnite na nekaj mestih na hrbtnem delu kože, predvsem na področju križa.
2. Lepilni trak prilepite na predmetno stekelce.
3. Poiščite sliko pod 40-kratno povečavo.
4. Najdene garjavce narišite.

DIAGNOSTIKA KOŽNIH GARJAVCEV

Najpogosteje iščemo garjavce, ki zajedajo v vrhnji plasti kože (*Sarcoptes* in *Notoedres*) ali dlačnih mešičkih (*Demodex*). Zaradi srbečice, ki jo povzročajo garjavci z vrtanjem kanalčkov v kožo, in neprestanega praskanja ima lahko žival ne samo brezdlačna mesta, ampak tudi obširne rane.

Material in inventar: skalpel, mineralno olje, predmetno stekelce, mikroskop.

NALOGA

1. S skalpelom drgnite na mestu med zdravim in bolnim tkivom, dokler se ne pojavijo prve kapljice krvi.
2. Na predmetno stekelce kanite kapljico mineralnega olja.
3. Dobljen kožni drobir razmažite po stekelcu.
4. Poiščite sliko pod 40-kratno povečavo.
5. Najdene garjavce narišite in identificirajte.

URINSKE PREISKAVE

Urinske preiskave so razmeroma enostavne, hitre in niso drage. Veterinarski tehnik lahko opravi z zelo malo laboratorijske opreme in reagentov celotne preiskave, ki dajo dober pregled v dogajanje v urinarnem traktu, lahko pa tudi o dogajanju v drugih organskih sistemih (npr. jetrih, trebušni slinavki).

Večino urinskih preiskav je potrebno opraviti takoj po odvzemu oz. v najkrajšem možnem času po odvzemu. Pri pošiljanju vzorca urina je velikega pomena spremni dopis, na kateremu morajo biti podatki: o lastniku in živali, načinu odvzema vzorca ter točen čas odvzema. Priporočeno je, da je vzorec v sterilni posodi, ki dobro tesni. Za večino preiskav je to le priporočljivo, medtem ko je za bakteriološko preiskavo to nujno potrebno.

Prvi korak k natančnim rezultatom je pravilen odvzem vzorca urina. S cistocintezo (pri malih živalih) in kateterizacijo se izognemo kontaminaciji vzorca iz distalnih delov urinarnega trakta in okolice. Prav tako je za pregled sedimenta urina najustreznejši prvi jutranji vzorec, ker je najbolj koncentriran.

Če želimo dobiti samo orientacijske vrednosti, zadostuje vzorec urina, ki ga dobimo pri spontanem uriniranju živali. Pri tem ni nujno, da ga zberemo v sterilno posodo. Dovolj je, da je čista. Preiskavo naredimo s hitrimi komercialnimi testi običajno v sami ambulanti. Veterinar se nato glede na rezultate testa odloči, ali je potrebno narediti dodatne natančnejše preiskave.

FIZIKALNE PREISKAVE URINA

Takoj po odvzemu urina določimo fizikalne vrednosti vzorca urina.

Material in inventar: vzorec urina, refraktometer, kapalka, destilirana voda, epruveta.

NALOGA

1. Določite barvo, vonj in prozornost urina.
2. S testnimi listki (z lakmusovim papirjem) določite pH urina.

3. Preočite nekaj mililitrov urina v epruveto in s stresanjem ugotovite, ali se peni.
4. Z refraktometrom določite specifično težo urina. Najprej umerite refraktometer z destilirano vodo. Specifična teža mora biti 1,000. Nato na suho prizmo refraktometra kanite dve kapljici urina in odčitajte specifično težo.
5. Če je specifična teža previsoka (se ne da odčitati), razredčite urin z destilirano vodo v razmerju 1:1 in ponovno odčitajte specifično težo.
6. Pri dobljenem rezultatu številke za vejico pomnožite z dve in dobili boste realno vrednost specifične teže.

Izpeljite postopek in napišite rezultat.

PRIPRAVA URINSKEGA SEDIMENTA

Za pripravo urinskega sedimenta potrebujemo 10–15 mL svežega urina.

Material in inventar: vzorec urina, centrifuga, centrifugirke oz. koničaste epruvete, predmetno in krovno stekelce, kapalka, barvilo, mikroskop.

NALOGA 1

1. V koničaste epruvete vlijte enake količine urina oz. toliko urina, da bo enaka njihova skupna teža.
2. Centrifugirajte 5 minut pri 3.000 obratih na minuto.
3. Odlijte supernatant oz. s kapalko zajemite samo sediment.
4. Če ste odlili supernatant sedimenta, ki je ostal na dnu epruvete, prenesite s kapalko na očiščeno predmetno stekelce dve kapljici (z vsake strani stekelca po eno).
5. Eno kapljico pustite nepobarvano (nativni preparat), drugo pa obarvajte z 1 % raztopino eozina, safranina, metilenskega modrila, kristalvioleta ali Türkovo raztopino.
6. Pokrijte s krovnim stekelcem in pregledajte pod mikroskopom.

Izpeljite postopek in narišite, kaj ste našli v nativnem in kaj v obarvanem preparatu.

NALOGA 2

1. V koničaste epruvete vlijte enake količine urina oz. toliko urina, da bo enaka njihova skupna teža.
2. Centrifugirajte 5 minut pri 3.000 obratih na minuto.
3. Odlijte supernatant in dodajte 1–2 kapljici barvila v sediment.
4. Pretresite sediment in barvilo s trkanjem po epruveti (frcanjem).
5. Prenesite zmes (eno kapljico) s kapalko na očiščeno predmetno stekelce.
6. Pokrijte s krovnim stekelcem in preglejte pod mikroskopom.

Izpeljite postopek in narišite, kaj ste našli v preparatu.

HITRI KOMERCIALNI TESTI

Za izvedbo postopka in vrednotenje rezultatov potrebujemo majhne količine svežega urina. Najmanjša možna količina za realno vrednotenje je 0,5 mL urina.

Na testnem traku so polja za določanje levkocitov, nitritov, pH, beljakovin, glukoze, ketonov, urobilinogena, bilirubina in krvi oz. hemoglobina v urina. Določeni testi lahko prikažejo tudi vrednost specifične teže urina.

Material in inventar: čaša z vzorcem urina, hitri test.

NALOGA

1. Testni trak v celoti namočite z urinom.
2. Takoj otresite odvečni urin in odčitajte vrednosti parametrov. Vse parametre lahko odčitamo takoj, razen tistih za vrednost levkocitov po 60–120 sekundah.
3. Odčitane vrednosti zapišite.

levkociti: vrednosti od neg. do 500 levkocitov/ μ L

nitriti: neg. oz. poz.

pH: izražen v št. 5–9

proteini: neg. do 5 g/l

glukoza: normalno do 5,5 mmol/l

ketoni: normalno do +++

urobilinogen: normalno do 200 μ mol/l

bilirubin: negativno do +++

kri oz. hemoglobin: negativno do 250 erc/ μ L

Izpeljite postopek in napišite izvid.

BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA URINA

V urinu lahko najdemo številne vrste bakterij. Zdrav urin ne vsebuje bakterij, vendar se lahko kontaminira z bakterijami iz nožnice, sramnice ali prepucija med uriniranjem. Pravilno odvzet vzorec urina s cistocintezo ali katetrom ne vsebuje bakterij.

Bakterije lahko pridejo v vzorec urina tudi iz zraka in se v njem na sobni temperaturi razmnožujejo. Zato je preiskavo potrebno narediti takoj iz svežega urina ali, če to ni mogoče, vzorec takoj zamrznemo. Ker so bakterije zelo majhne, jih v nativnem preparatu težko vidimo (urinski sediment). Vidnejše postanejo, ko preparat obarvamo.

Za natančnejšo bakteriološko preiskavo uporabimo zahtevnejše metode, s katerimi določimo število bakterij in vrsto. Vrsto bakterij lahko določimo šele po končani primarni preiskavi in nato z izolacijo, barvanjem in determinacijo določimo vrsto. Obenem lahko naredimo antibiogram, kar pomaga veterinarju pri izboru terapije.

PREISKAVA PO SANFORDU

Potrebujemo najmanj 1 mL svežega urina.

Material in inventar: štiri epruvete, fiziološka raztopina, 10 in 1 mL sterilne pipete zavite v alufolijo, tri sterilne petrijevke, sterilno pripravljen krvni agar, stojalo za epruvete, inkubator.

NALOGA

1. V vsako epruveto nalijte 9 mL fiziološke raztopine.
2. Epruvete zamašite s kovinskimi zamaški in avtoklavirajte 15 minut pri 121 °C.
3. Ko se epruvete ohladijo, vlijte v prvo epruveto 1 mL urina.
4. V vsako naslednjo epruveto prenesite po 1 mL razredčenega urina prejšnje epruvete tako, da dobite razredčine 10^{-1} do 10^{-4} .
5. V eno petrijevko vlijte 1 mL urina in prelijte s krvnim agarjem.

6. V naslednji dve petrijevki vlijte po 1 mL iz epruvet razredčitve 10^{-3} in 10^{-4} .
7. Prelijte s krvnim agarjem.
8. Inkubirajte petrijevke pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 ur in preštejte število kolonij na vsaki petrijevki.
9. Izračunajte, glede na razredčitev, koliko bakterij je v vzorcu urina.

Skicirajte postopek. Izpeljite nalogo in napišite rezultat.

Pregled vzorca lahko nadaljujete tako, da izpeljete determinacijo bakterije in naredite antibiogram (glej vaje iz mikrobiologije).

PREGLED URINA NA BELJAKOVINE

V urinu normalno ni beljakovin ali so prisotne le v sledovih (predvsem, če je vzorec urina vzet s cistocintezo ali katetrom), zato moramo vsako prisotnost bakterij pravilno ovrednotiti. Pri zdravih živalih se plazmatske beljakovine filtrirajo skozi glomerule in nazaj resorbirajo skozi ledvične cevčice, še preden nastane sekundarni urin. Poškodbe pri odvzemu s cistocintezo ali katetrom lahko povzročijo prisotnost beljakovin. Prav tako srednji curek pri uriniranju lahko vsebuje beljakovine iz nožnice ali prepucija. To moramo upoštevati pri vrednotenju rezultatov.

Prisotnost beljakovin v urinu moramo ovrednotiti tudi glede na druge vrednosti, kot so: prisotnost krvnih celic, hemoglobina, koncentracije urina in drugih znakov vnetja.

Koncentracijo in samo prisotnost beljakovin v urinu lahko določimo na več načinov.

PREIZKUS S SULFOSALICILNO KISLINO

Preizkus je izredno občutljiv za vse vrste beljakovin do koncentracije 0,01 %.

Material in inventar: vzorec urina, epruveti 10 x 75 mm, 3 % sulfosalicilna kislina, 5 mL pipeta.

NALOGA

1. Pripravite 3 % sulfosalicilno kislino tako, da zmešate 30 g sulfosalicilne kisline z 1 L vode.
2. V dve epruveti nalijte po 1 mL urina.
3. Prvemu vzorcu dodajte 3 mL 3 % sulfosalicilne kisline, drugem pa 3 mL vode za primerjavo.
4. Zmešajte na rahlo z obračanjem epruvete.
5. Primerjate obe epruveti in glede na razlike ovrednotite preizkus.

Izpeljite postopek in ovrednotite dobljen rezultat.

- neg. ni videti motnosti (oba vzorca sta enaka)
- + rahlo opazna motnost
- ++ večja motnost dobro vidna na črni podlagi
- +++ zelo moten vzorec, lahko posamezni kosmiči
- ++++ izrazita motnost in kosmiči

HELLERJEV PREIZKUS S KONCENTRIRANO SOLITRNO KISLINO

Preizkus je občutljiv le na acidalbumine do koncentracije 0,02 %. Za preiskavo potrebujemo najmanj 2 mL urina.

Material in inventar: vzorec urina, epruveta, solitrna kislina.

NALOGA

1. V epruveto nalijte 1–2 mL nekadeče se koncentrirane solitrne kisline.
2. Previdno in ob steni dodajte nekaj mililitrov urina tako, da se tekočini ne mešata.

Pri pozitivni reakciji se na ploskvi, kjer se tekočini stikata, pojavi bel obroč.

Izpeljite postopek in ovrednotite rezultat.

PREIZKUS S KUHANJEM

Preizkus je zelo občutljiv in lahko ugotovimo že 0,1 % beljakovin v urinu, le da potrebujemo nekoliko večje količine urina.

Material in inventar: vzorec urina, epruveta, pipeta, ščipalka, gorilnik, 10 % očetna kislina, kapalka.

NALOGA

1. V epruveto nalijte 10 mL filtriranega urina. Če je urin moten, dodajte takoj nekaj kapljic očetne kisline, da se zbistri.
2. Urin segrevajte v zgornjem delu do vrenja tako, da ostane spodnji del tekočine hladen.
3. Ob robu dodajte nekaj kapljic 10 % očetne kisline.

Motnost urina kaže na prisotnost beljakovin v urinu. Če je motnost povzročilo obarjanje kalcijevega in magnezijevega fosfata ter kalcijevega karbonata, se urin po dodatku 10 % očetne kisline razbistri; če pa so prisotne beljakovine, ostane moten.

Izpeljite postopek in ovrednotite rezultat.

PREIZKUS PO ESBACHU

Pri tem preizkusu gre za kvantitativno ugotavljanje beljakovin.

Material in inventar: vzorec urina, Esbachova epruveta, Esbachov reagent (2,5 mL acid picricum; 5,0 mL acid citricum; 250 mL destilirane vode).

NALOGA

1. Esbachovo epruveto napolnite do oznake U z urinom.
2. Do oznake R nalijte Esbachov reagent in premešajte.
3. Epruveto pustite na sobni temperaturi za 24 ur, nakar odčitajte na skali količino beljakovin v mg%.

Izpeljite postopek in ovrednotite rezultat.

UGOTAVLJANJE SPECIFIČNE TEŽE URINA

Na razpolago imamo več metod za ugotavljanje specifične teže urina. Danes najpogosteje uporabljamo metodo z refraktometrom.

Material in inventar: vzorec urina, kapalka, refraktometer, epruveta, destilirana voda.

NALOGA

1. Urin centrifugirajte pri 100–200 obratih 5 minut.
2. Kapljico supernatanta kanite na stekleno ploščico, pokrijte s plastičnim pokrovčkom in odčitajte specifično težo na skali. Če je specifična teža višja od skale na refraktometru, je potrebno urin razredčiti, in to upoštevati pri dobljenem rezultatu.
3. Odpipetirajte 0,5 mL urina, 0,5 mL destilirane vode in na rahlo premešajte. Postopek z refraktometrom ponovite. Dobljeni rezultat je potrebno pomnožiti.

Primer: 1:1 razredčen urin sp. teže 1.036

$$1. \quad 0.036 \times 2 = 0.072$$

$$2. \quad \text{Realna specifična teža urina je } 1.072.$$

Izpeljite postopek in zapišite rezultat.

Za določanje specifične teže urina uporabljamo tudi urinometer, ki ga damo v vzorec urina tako, da se ne dotika stene ali dna posode. Ko se urinometer umiri, odčitamo na njegovi skali specifično težo urina. To počnemo pri sobni temperaturi 20–24 °C, sicer moramo vrednost specifične teže preračunati po posebni skali. V mali praksi je določanje specifične teže z urinometrom zelo težko izpeljati, ker potrebujemo vsaj 40 mL urina.

KRVNE PREISKAVE

Krvne preiskave pomagajo veterinarju ugotoviti splošno stanje in bolezenske procese pri domačih živalih.

Kri za krvne preiskave naj bi bila odvzeta iz velike vene, najbolje zjutraj na tešče. Takoj po odvzemu jo shranimo. Za hematološke preiskave jo odvezamemo z antikoagulantom, za biokemične in serološke pa lahko brez njega. Najprimernejši in najbolj razširjen antikoagulant je EDTA (ethylenediaminotetraacetat). Za ta namen so najprimernejše vakuumske epruvete, katerim je že dodana določena količina antikoagulant. Kri dodamo do oznake, da je razmerje krvi in antikoagulant pravilno. Nativno kri shranimo do preiskave na suhem pri sobni temperaturi, če bomo preiskavo naredili v dveh urah. Drugače moramo dati kri v hladilnik na + 4 °C. Kri za biokemične preiskave pustimo 24 ur na sobni temperaturi, da se izloči serum.

Pred preiskavo je potrebno vzorec polne krvi previdno premešati, sicer lahko pride do napačnih rezultatov. Eritrociti pri konju se npr. začnejo hitro po odvzemu sesedati. Če takšna kri ni dobro premešana in je vzorec za preiskavo odvzet z vrha epruvete, lahko napačno ugotovimo, da ima konj premajhno število eritrocitov. Epruvete s krvjo nežno premešamo v roki za nekaj sekund ali na napravi za mešanje.

PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA

Za pripravo krvnega razmaza potrebujemo polno kri ali na mestu odvzema naredimo razmaz ene kapljice krvi.

Material in inventar: vzorec polne krvi, kapalka, predmetna stekelca.

NALOGA

1. Predmetna stekelca dobro razmastite in posušite.
2. Vzorec krvi narahlo in dobro premešajte.
3. S kapalko ali kapilarno cevčico nanesite kapljico krvi premera 1–2 mm na začetni del predmetnega stekelca.

4. Drugo predmetno stekelce položite pred kapljico krvi tako, da je nagnjeno pod kotom 35–45° nad kapljico.
5. Z zgornjim predmetnim stekelcem se dotaknite kapljice krvi tako, da se razleze po robu stekelca.
6. Hitro in enakomerno potegnite stekelce v nasprotno smer.
7. Razmaz pustite na sobni temperaturi, da se popolnoma posuši.

Skicirajte in izpeljite postopek.

Razmaz ne sme biti ne predebel ne pretanek. Običajno si pripravimo več razmazov, da lahko izberemo najprimernejšega.

Pod kakšnim kotom postavimo zgornje predmetno stekelce na spodnjega, je odvisno od gostote krvi. Pri gosti krvi (hemokoncentraciji) naj bo kot manjši. Pri redkejši krvi (anemiji) priporočamo večji kot med stekelcema.

BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA PO METODI MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Krvni razmaz pripravljen po prejšnjem postopku je primeren za nadaljnje barvanje.

Material in inventar: vzorec krvi, predmetna stekelca, kapalka, barvila, destilirana voda, alkohol, mikroskop.

NALOGA

1. Po prejšnjem postopku pripravite krvni razmaz.
2. Razmaz fiksirajte 5 minut v metanolu in prelijte z raztopino May-Grunwald. Pustite jo na razmazu 3 minute.
3. Razmaz prelijte z destilirano vodo, da odstranite odvečno barvilo.
4. Po 1 uri razredčeno barvilo odlijte s predmetnega stekelca, razmaz pa prelijte z razredčeno raztopino Giemse (1 mL Giemse v 9 mL destilirane vode).
5. Razmaz pustite stati 15 minut in nato sperite z destilirano vodo.

6. Ko postane razmaz svetlo rdeč (približno 1–2 minuti), odlijte odvečno vodo in posušite na zraku.
7. Preglejte pod mikroskopom.

Pripravite obarvani krvni razmaz, primeren za pregled krvnih celic.

BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA Z DIFF-QUICKOVIMI BARVILI

Zaradi dolgo trajajočega postopka barvanja se na tržišču pojavljajo kompleti za barvanje krvnega razmaza, ki postopek lahko skrajšajo na 15 sekund. Uporabljamo tri pripravljene reagente:

1. raztopino za fiksacijo, trajno zeleno v metanolu,
2. eosin G in fosfatni pufer (pH 6,6),
3. tiozinsko barvilo v fosfatnem pufru (pH 6,6).

Material in inventar: krvni razmaz, Diff-Quickova barvila v treh čašah, mikroskop.

NALOGA

1. Pripravite raztopine za barvanje po navodilu.
2. Nalijte v čaše po 1 dcl barvila.
3. Krvni razmaz pomočite trikrat v prvi reagent (fiksator), vsakič po eno sekundo.
4. Narahlo otresite in se s spodnjim robom dotaknite papirnate brisače.
5. Ponovite v preostalih dveh barvah.
6. Sperite z destilirano vodo s pH 7,2 in preglejte krvni razmaz pod mikroskopom.

Izpeljite postopek in ocenite ustreznost obarvanosti krvnega razmaza.

MIKROSKOPIRANJE KRVNIH RAZMAZOV

Krvne razmaze mikroskopiramo pod 1000-kratno (imerzijsko) povečavo. Mikroskopiramo v najtanjšem delu razmaza blizu konice repa razmaza, kjer se glede gostote ravnamo po eritrocitih. Eritrociti morajo biti enakomerno razporejeni po celotnem vidnem polju, drug zraven drugega, vendar ne kot domine. Ne smejo se prekrivati in med njimi ne sme biti prevelikih praznih prostorov (otočkov).

Velikost levkocitov in trombocitov vedno primerjamo z velikostjo eritrocita. Primerjamo tudi obarvanost celic. Če se ne moremo odločiti, katero celico gledamo, si moramo ogledati še druge celice na kakšnem drugem delu krvnega razmaza.

Material in material: obarvan krvni razmaz, barvice, mikroskop, imerzijsko olje.

NALOGA

1. Pod 400-kratno povečavo poiščite ustrezen del razmaza za mikroskopiranje in oceno krvnih celic.
2. Premaknite revolver tako, da sta nad predmetnim steklom 40-kratni in imerzijski objektiv postavljeni vsak na svojo stran.
3. Na del obarvanega krvnega razmaza, kjer se vidi snop svetlobe, kanite kapljico imerzijskega olja, pomočite imerzijski objektiv v olje in poiščite sliko.
4. Primerjajte vidni polji mikroskopa (pod 400- in 1000-kratno povečavo).
5. Ocenite kakovost gostote razmaza.
6. Ocenite kakovost obarvanosti posameznih celic v razmazu.
7. Poiščite posamezne krvne celice in jih narišite v pravilnem razmerju do eritrocitov.

POGOSTE NAPAKE

Neprimeren krvni razmaz:

- pretanek ali pregost,
- prehiter prehod med gostim in redkim delom.

Slabo obarvan razmaz:

- eritrociti niso rožnati (so sivi, sivo modri),
- citoplazma levkocitov ni svetlomodre barve,
- jedro levkocitov je zabrisano,
- granule v eni celici so različnih barv.

DOLOČANJE ŠTEVILA KRVNIH CELIC

Število krvnih celic se v normalnih razmerah določa v avtomatskih analizatorjih. Štetja se lotimo ročno le, ko nimamo možnosti, da bi uporabili analizator. Veterinarski tehnik naj bi to zelo zahtevno tehniko obvladal.

Za štetje eritrocitov in levkocitov uporabljamo Bürker-Türkovo komoro. Vsi hemocitometri za štetje krvnih celic, kot tudi Bürker-Türkova komora, imajo globino 0,1 mm in površino mrežice 9 mm². Površina najmanjšega kvadratika v sredinskem delu komore, kjer štejemo eritrocite in trombocite, znaša 1/400 mm² ali 0,0025 mm². Sredinski (najbolj zamrežen) kvadrat s površino 1 mm² je razdeljen na 16 manjših kvadratov s površino 1/25 mm², ti pa še na 16 najmanjših kvadratkov s površino 0,0025 mm².

Eritrocite štejemo na površini petih kvadratov s celotno površino 0,2 mm² (5 x 0,04 mm²). Celice, ki so na črti, prištejemo kvadratu, v katerem štejemo, če ležijo na zgornji ali desni črti (na robu) kvadrata.

Formulo za izračun številčne koncentracije eritrocitov dobimo tako, da upoštevamo površino prešteti kvadratkov, globino komore in razredčitev, vse skupaj pa preračunamo na μL krvi. Za razredčitev uporabljamo 0,85 % fiziološko raztopino v razmerju 1 : 200 (kri : fiziološka raztopina). Če nimamo posebnih pipet za razredčitev, v katere dodajamo kri oz. fiziološko raztopino, ju lahko zmešamo v posebni epruveti.

Vedno štejemo v obeh mrežicah Bürker-Türkove komore. Števili se ne smeta razlikovati za več kot 10 %. Če je razlika večja, je komora verjetno nepravilno napolnjena in moramo postopek ponoviti.

Standardna razredčitev za eritrocite je 1/200, faktor volumna pa 0,02. To pomeni, da dobljeno število eritrocitov pomnožimo z 10.000. Npr. če preštejemo v eni komori 420 eritrocitov in v drugi 440, najprej izračunamo povprečje, ki je 430 eritrocitov. To število pomnožimo z 10.000 in dobimo 4.300.000 ali $4,3 \times 10^6/\mu\text{L}$.

Material in inventar: polna kri, 0,85 % fiziološka raztopina, pipete, epruveta, Bürker-Türkova komora, mikroskop.

NALOGA (določanje števila eritrocitov)

1. Epruveto napolnite z 0,01 mL polne krvi in 2 mL 0,85 % fiziološke raztopine in dobro premešajte.
2. Bürker-Türkovo komoro in krovno stekelce razmastite z etanolom.
3. Robove komore rahlo navlažite in prilepite krovno stekelce na komoro. Ko pogledate pod kotom, vidite mavrico na mestu, kjer se stekli stikata.
4. Napolnite Bürker-Türkovo komoro tako, da pod krovnim stekelcem ni mehurčkov zraka in da se raztopina ne izliva.
5. Poiščite sliko pod 400-kratno povečavo. Zaprite zaslonko, pojačajte svetlobo in nastavite kondenzor.
6. Preštajte eritrocite v petih poljih sredinskega kvadrata (štiri vogalne in enega centralnega).
7. Ponovite štetje na drugi mrežici in izračunajte povprečje eritrocitov.
8. Izračunajte, koliko je eritrocitov na μL krvi.

Levkocite štejemo v štirih vogalnih in centralnem kvadrantu mrežice. Kri najprej razredčimo s 3 % raztopino acid alkohola v razmerju 1 : 100. Komoro napolnimo šele po desetih minutah. V tem času bodo eritrociti popokali. Kri je potrebno večkrat premešati. Ko preštujemo levkocite v obeh mrežicah, izračunamo povprečje. Nato upoštevamo razredčitev 1 : 100 in volumen vzorca, kar pomeni, da dobljeno število levkocitov enostavno pomnožimo s 100 (preštujemo 76 levkocitov, kar pomeni $7,6 \times 10^3$ levkocitov na μL krvi).

Material in inventar: polna kri, 3 % acid alkohol, pipete, epruveta, Bürker-Türkova komora, mikroskop.

NALOGA (določanje števila eritrocitov)

1. Epruveto napolnite z 0,02 mL polne krvi in 2 mL 3 % acid alkohola. Mešajte 10 minut.
2. Bürker-Türkovo komoro in krovno stekelce razmastite z etanolom.

3. Robove komore rahlo navlažite in prilepite krovno stekelce na komoro. Ko pogledate pod kotom, vidite mavrico na mestu, kjer se stekli stikata.
4. Napolnite Bürker-Türkovo komoro tako, da pod krovnim stekelcem ni mehurčkov zraka in da se raztopina ne izliva v kanalček.
5. Poiščite sliko pod 400-kratno povečavo. Zaprite zaslonko, pojačajte svetlobo in nastavite kondenzor.
6. Preštajte levkocite v štirih vogalnih in centralnem kvadrantu.
7. Ponovite štetje na drugi mrežici in izračunajte povprečje levkocitov.
8. Izračunajte, koliko je levkocitov na μL krvi.

Skicirajte Bürker-Türkovo komoro in mrežo na njej. Določite, kje na mreži štejemo levkocite in kje eritrocite.

DOLOČANJE SEDIMENTACIJE KRVI PO WESTERGREENU

V vzorcu krvi z antikoagulantom se krvne celice začnejo sesedati, in sicer eritrociti hitreje kot levkociti. To preiskavo uporabljamo za ugotavljanje intenzivnosti vnetnih procesov v organizmu. Pri vnetju se sproščajo vnetni dejavniki, beljakovine, ki zlepljajo eritrocite v krvi in se ti zato hitreje sesedajo.

Material in inventar: Westergreenova pipeta, stojalo za pipete, polna kri.

NALOGA

1. Nativno kri v razmerju 1 : 4 (antikoagulant : kri) dobro premešajte z obračanjem.
2. Westergreenovo pipeto napolnite s polno krvjo neposredno iz epruvete do oznake 0.
3. Pipeto postavite vertikalno ali pod kotom 45° oz. 60° tako, da se vrh pipete opira na gumijast zamašek.
4. Rezultate odčitajte pri vertikalni metodi po 1, 2 in 24 urah; pri poševni metodi pa po 7, 10 in 20 minutah.

Izpeljite postopek in navedite, kaj pospeši oz. zavira sedimentacijo krvi. Ugotovite, katera žival ima najhitrejšo sedimentacijo eritrocitov.

DOLOČANJE VREDNOSTI HEMATOKRITA

Vrednost hematokrita nam pove, ali je in koliko organizem dehidriran. Z njim ugotavljamo tudi vrsto anemije pri živalih (mikrocitno, makrocitno itd.). Vrednost hematokrita je pravzaprav razmerje med volumnom stisnjenih eritrocitov in celotno krvjo. Postopek je zahteven, ker potrebujemo mikrohematokritsko centrifugo. Lahko si pomagamo tudi z navadno.

Material in inventar: vzorec polne krvi, hematokritske cevčice, glineni zamaški, centrifuga, čitalec vrednosti hematokrita.

NALOGA

1. Vzorec polne krvi na rahlo in enakomerno premešajte.
2. Hematokritske cevčice postavite z enim koncem v kri in pustite, da se zaradi kapilarnega tlaka napolnijo.
3. Na zgornjo odprtino postavite kazalec, da zaprete odprtino in izvlecite cevčice iz krvi.
4. Obrišite spodnje dele cevčic in jih zamašite z glinenim zamaškom.
5. Cevčice postavite enakomerno v hematokritsko centrifugo.
6. Centrifugo vklopite in nastavite na 3.000 obratov na minuto.
7. Po končanem centrifugiranju postavite cevčice eno za drugo na hematokritski čitalec. Spodnji rob na spodnjo črtico, zgornjega pa na zgornjo črtico, ki je označena s 100 %.
8. Na meji med eritrociti in krvno plazmo odčitajte vrednost hematokrita.

Če nimamo hematokritske centrifuge, si lahko pomagamo tako, da napolnimo Westergreenove pipete do oznake. Centrifugo nastavimo na 3.000 obratov in po petih minutah odčitamo rezultat na zgornjem robu eritrocitov. Dobljen rezultat pomnožimo z 10 in dobimo vrednost hematokrita v odstotkih.

Izpeljite postopek in zapišite vrednost hematokrita.

DOLOČANJE ČASA KOAGULACIJE KRVI

Določitev časa koagulacije krvi omogoča vpogled v prve tri faze koagulacije. Preiskavo lahko naredimo le v ambulanti za male živali, kjer imamo na razpolago vse pripomočke.

Material in inventar: vzorec krvi, igle, brizge, epruvete s premerom 8 mm, gumijasti zamaški, vodna kopel, kronometer.

NALOGA

1. Odvzemite 3–5 mL krvi in začnite meriti čas.
2. V 3 suhe in čiste epruvete takoj natočite iz brizge po 1 mL krvi.
3. Takoj jih zamašite z gumijastim zamaškom in postavite v vodno kopel na 37 °C.
4. Po 2 minutah opazujte strjevanje krvi v epruveh vsakih 30 sekund.
5. Epruvete vzemite iz vodne kopeli in jih rahlo nagnite, da ugotovite, ali je kri še tekoča.
6. Ko ugotovite, da se je kri strdila, zapišite čas za vsako epruveto posebej.
7. Nato izračunajte povprečen čas koagulacije v 3 epruveh.

Normalen čas koagulacije po tej metodi je pri konju okoli 11 minut, pri govedu in ovci 4–15 minut, pri psu in kuncu 3–12 minut ter pri mački 8 minut.

Izpeljite postopek in napišite ugotovitve glede na izračunan čas koagulacije.

PREISKAVE MLEKA

Vzorci mleka lahko preiskujemo v različnih laboratorijih, in sicer v mikrobioloških laboratorijih in laboratorijih za higieno živil. Mi se s preiskavami, s katerimi ugotavljajo samo kakovost mleka, ki vključuje količino posameznih hranilnih snovi, ne bomo ukvarjali.

Osredotočili se bomo na mikrobiološke preiskave in na preiskave, ki vključujejo zaviralne snovi v mleku.

Današnje zahteve tržišča po visoko kakovostnem mleku so velike. Zmanjšuje se dovoljeno število mikroorganizmov in somatskih celic, redno ugotavljajo zaviralne snovi in koncentracije beljakovin, maščob, suhe snovi idr.

Preiskave morajo biti zelo natančne, ker že majhne napake lahko privedejo do uničenja velikih količin mleka oz. mu zmanjšajo odkupno ceno ali spustijo v promet neustrezno ali celo škodljivo mleko.

UGOTAVLJANJE ZAVIRALNIH SNOVI

Zaviralne snovi v mleku in mlečnih izdelkih so: antibiotiki in kemoterapevtiki, pesticidi, težke kovine, nitriti, nitrati in nitrozamini, mikotoksini, poliklorani, bifenili, detergenti in razkužila. Te snovi preprečujejo razmnoževanje mlečnih kultur in s tem zorenje izdelkov (sirov) ter tvorbo kisline (jogurt, kislo mleko).

Za dokazovanje prisotnosti antibiotikov v mleku uporabljamo že industrijsko pripravljene komplete, ki vsebujejo bakterijsko kulturo. Ko jih dodamo preiskovanemu mleku, pride po določenem času inkubacije (pri 64 °C približno 3 ure) do vidne reakcije, če antibiotik ni prisoten, in obratno. Običajno se barva spremeni zaradi nastanka kislin.

Pri klasični metodi vzorec mleka pasteuriziramo, dodamo jogurtovo kulturo in metilensko modrilo. Po določenem času inkubacije (pri 45 °C 4 ure) se pri negativni reakciji na antibiotike metilensko barvilo razbarva in spremeni se konsistenca mleka (sesiri se).

Material in inventar: vzorec mleka, epruveta, jogurtova kultura, metilensko modrilo, vodna kopel.

NALOGA

1. Mleko segrejte za 3 minute na 72 °C.
2. Ohlajenemu mleku dodajte jogurtovo kulturo in dobro premešajte.
3. Dodajte nekaj kapljic metilenskega modrila.
4. Mleko postavite na 27 °C in opazujte, ali bo prišlo do razbarvanja.

Izpeljite postopek in ovrednotite rezultat.

UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V MLEKU

Preiskavo opravimo redno enkrat na mesec iz vzorcev, vzetih v enem hlevu ali od posamezne krave, za tisto mleko, ki je namenjeno prodaji.

Material in inventar: vzorec mleka, štiri epruvete, fiziološka raztopina, 1 in 10 mL sterilne pipete, stojalo za epruvete, hranilni agar, termostat, gorilnik.

NALOGA

1. V vsako epruveto nalijte 9 mL fiziološke raztopine.
2. Epruvete zamašite s kovinskim zamaškom in jih avtoklavirajte 15 minut na 121 °C.
3. Ohlajene in sterilne epruvete so primerne za nadaljnji postopek.
4. V prvo epruveto vlijte 1 mL mleka in premešajte.
5. V vsako naslednjo epruveto prenesite po 1 mL razredčenega mleka prejšnje epruvete tako, da dobite razredčitve 10^{-1} do 10^{-4} .
6. V eno petrijevko vlijte 1 mL mleka 10^{-3} in v drugo iz epruvete razredčitve 10^{-4} .
7. Prelijte s tekočim hranilnim agarjem.
8. Inkubirajte pri 30 °C 72 ur in nato preštejte število kolonij na vsaki petrijevki.
9. Glede na razredčitev izračunajte, koliko bakterij je v vzorcu mleka.

Skicirajte in izpeljite postopek. Napišite rezultat in ugotovite, ali je mleko ustrezno za prehrano ljudi.

UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ V VZORCU MLEKA – MASTITIS

Pri povečanem številu somatskih celic in sumu na mastitis je velika verjetnost, da gre za infekcijo mlečne žleze. Pri trdovratnih, dlje časa trajajočih in hudih infekcijah je potrebno izolirati povzročitelja in po potrebi izdelati antibiogram. Za to preiskavo je potrebno po posebnem postopku odvzeti mleko vsaki sumljivi kravi iz vsake četrti.

ODVZEM VZORCA MLEKA

Za mikrobiološko preiskavo mleka potrebujemo sterilne epruvete, ki so ustrezno označene glede na kravo in mlečne četrti (1/I, 1/II, 1/III, 1/IV, 2/I itd.). Pred odvzemom vzorca mleka vime očistimo in do suhega obrišemo. Nato s kosmičem vate, namočenega v 70 % etanol, razkužimo vršičke seskov I–IV četrti. Vzorce mleka namolžemo v epruveto IV–I četrti, da se ne bi z dlanjo dotaknili že razkuženih seskov.

Prve curke mleka izmolžemo v posebno posodo. Nato sterilno epruveto odmašimo tako, da z mezincem leve roke objamemo zamašek in odpremo epruveto ter jo preprimemo s preostalimi prsti iste roke. Z desno roko namolžemo mleko v epruveto in pri tem pazimo, da ne onesnažimo (kontaminiramo) vzorca mleka. Epruveto nato zamašimo in po istem postopku odvzamemo mleko še iz preostalih četrti.

Za to preiskavo potrebujemo krvni ali čokoladni agar, ker gre običajno za občutljivejše patogene bakterije, ki na hranilnem agarju slabo rastejo ali sploh ne.

Material in inventar: krvni ali čokoladni agar, alkoholni flomaster, vzorci mleka, stojalo za epruvete, bakteriološka zanka, gorilnik, inkubator.

NALOGA 1

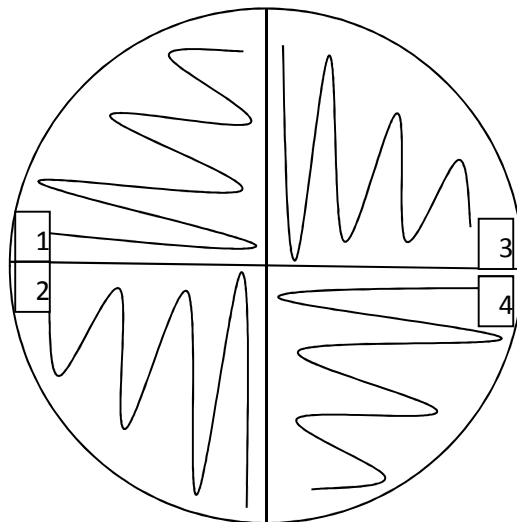
1. Po navodilih stehtajte potrebno količino krvnega agarja za 250 mL destilirane vode.
2. V erlenmajerici dobro zmešajte krvni agar z destilirano vodo.
3. Zamašite erlenmajerico z alufolijo in postavite v avtoklav na 121 °C za 15 minut.

4. Po končani sterilizaciji primešajte agarju defibrinirano kri. Za pripravo krvnega agarja mora biti temperatura agarja 40–50 °C, za pripravo čokoladnega pa 60 °C (pri tej temperaturi eritrociti popokajo in dajo agarju lepo čokoladno barvo).
5. Ob gorilniku prelijte agar v petrijevke.

NALOGA 2

1. Na dno petrijevke s krvnim agarjem narišite z alkoholnim flomastrom dve črti tako, da razdelite površino na četrtine, in petrijevke ustrezno označite (hlev, krava, četrt).
2. Mleko v epruvetah dobro premešajte (mleko se ne sme speniti).
3. Ožgite bakteriološko zanko in jo ohladite v sterilnem agarju.
4. Iz prve epruvete z zanko zajemite vzorec in ga z nekaj cikcakastimi gibi nanesite na označeno četrt na petrijevki.
5. To ponovite s preostalimi tremi vzorci.
6. Inkubirajte na 37 °C 24 ur.

Izpeljite postopek, ugotovite število kolonij in jih opišite. Po končanem inkubiranju je potrebno izolirati posamezne bakterije, narediti čisto kulturo, determinirati bakterije in po potrebi izdelati antibiogram (glej vaje iz bakteriologije).



Slika 1: Nanašanje vzorcev na gojišče

PREISKAVE SEMENA

Danes večino preiskav naredijo v osemenjevalnih centrih, kjer imajo visoko usposobljen kader in ustrezno opremo. Vse preiskave opravijo za to namenjene aparature, razen makroskopskega pregleda semena in subjektivne ocene progresivno gibljivih semenčic. To naredi izkušen strokovnjak po lastni presoji in si pri tem pomaga samo z mikroskopom.

V mali praksi občasno naredimo oceno semena, ko se stranke odločijo za umetno osemenjevanje ali če plemenjak po večkratnih poskusih ni naskočil samice. Običajno gre za neizkušena samca ali samica ne dovoli zaskoka.

Običajno pregledujemo nativno seme, pravkar dobljeno od plemenjaka. Zelo redko pregledujemo zamrznjeno seme. V vsakem primeru naj bi preiskavo opravili pred zamrzovanjem.

Najprej ocenimo gibljivost semenčic (progresivno gibanje do 70 % semenčic) in poškodbe samih semenčic. Nato je potrebno določiti skupno število vseh semenčic v 1 mL ejakulata.

Ker je teh preiskav malo, je razumljivo, da potrebujemo veterinarskega tehnika, ki bo zanesljivo podal točno oceno semena. Obenem je potrebno računati na stroške odvzema in pregleda ter na to, da je psica godna za parjenje le nekaj dni v letu.

STOPNJE POŠKODOVANOSTI SEMENČIC

Sposobnost plemenjaka za osemenitev samice ocenjujemo tudi po napakah na samih spermijih, ki so lahko prirojene ali pa je seme samo nezrelo (prisotnost citoplazmatske kapljice). Pri pregledu odtajanega semena moramo upoštevati, da zamrzovanje in odtajanje vplivata na preživetje semenčic.

S preiskavo ugotavljamo, kakšne in kolikšne so poškodbe semenčic oz. kakšna je njihova oploditvena sposobnost. Za preiskavo potrebujemo nekaj kapljic svežega ejakulata ali vzorec zamrznjenega semena.

Material in inventar: vzorec semena, predmetno in krovno stekelce, kapalka, metilensko modrilo, mikroskop.

NALOGA

1. Nekaj kapljic semena prenesite v čisto epruveto.
2. Dodajte nekaj kapljic metilenskega modrila in rahlo premešajte.
3. Po desetih minutah prenesite eno kapljico na predmetno stekelce in pokrijte s krovnim.
4. Preparat pregledajte in ugotovite morfološke spremembe.
5. Če imate zamrznjeno seme, ga najprej odtajajte v topli vodi (38 °C) 10 sekund.

Izpeljite postopek in narišite morfološko spremenjene semenčice ter določite odstotek poškodovanih semenčic oz. takih, ki nimajo oploditvene sposobnosti.

S to preiskavo lahko ugotovimo tudi delež živih semenčic. Ob barvanju je membrana živih semenčic prepustna za barvilo, zato so žive celice pod mikroskopom videti rahlo modre barve.

ŠTETJE SEMENČIC

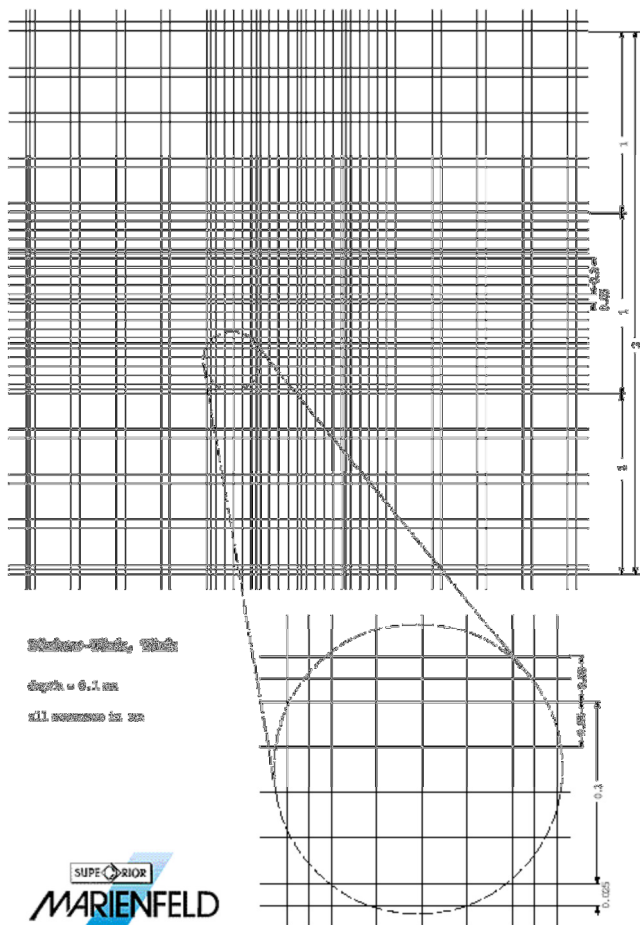
Za štetje semenčic lahko uporabimo Bürker-Türkovo komoro. Ta je sestavljena iz objektnega stekla, na katerem je mreža, in krovnega stekla. Pred delom moramo komoro dobro očistiti in razmastiti zaradi zahtevnosti mikroskopiranja.

Material in inventar: slamica s semenom ali nativno seme, topla voda, Bürker-Türkova komora, mikroskop.

NALOGA

1. Kanite eno kapljico semena na sredino mreže in pokrijte s krovnim stekelcem. Pod njim ne sme biti nobenega zračnega mehurčka.
2. Poiščite sliko pod 400-kratno povečavo (za lažje mikroskopiranje zaprite zaslonko, pojačajte svetlobo in naravnajte kondenzor).
3. Preštejte, koliko je semenčic v vseh 16 kvadratih oz. v 8 centralnega kvadranta in izračunajte povprečje celic v enem kvadratu.
4. Ker je volumen semena v komori $0,1\text{mm}^3$, pomnožite dobljeno število z 10^4 . Tako izračunate število semenčic v 1 mL semena.

Izpeljite postopek in ugotovite uporabnost semena.



Slika 2: Bürker Türkova komora

PREISKAVA BRISA MATERNIČNEGA VRATU

Bris materničnega vratu lahko pregledamo, da ugotovimo, v katerem stadiju gonitve se nahaja psica ali za citološke preiskave. Bris lahko uporabimo tudi za izolacijo povzročitelja vnetja. Pogosteje uporabimo vaginalni bris, ki je prav tako uporaben.

Opisali bomo postopek priprave preparata cervikalnega brisa, ki se ne razlikuje od priprave vaginalnega preparata.

Ko ugotavljamo čas ciklusa, iščemo superficialne celice (velike poroženele celice brez jedra), določamo njihovo število in tendenco spremembe.

Material in inventar: bris materničnega vratu, predmetna stekelca, Diff-Quikovo barvilo, mikroskop.

NALOGA

1. Bris razmažite po eni polovici predmetnih stekelc z enakomernim obračanjem vatrane palčke. To ponovite večkrat na dveh predmetnih stekelcih.
2. En preparat pustite nepobarvan, drugega obarvajte z Diff-Quikovim barvilom.
3. Cervikalni razmaz pomočite v prvo barvo trikrat po eno sekundo, otesite barvo s stekelca in obrišite spodnjo ploskev.
4. Ponovite v preostalih dveh barvah.
5. Sperite z destilirano vodo s pH 7,2 in preglejte pod mikroskopom.

Izpeljite postopek in narišite dobljene celice v razmerju ene celice do druge.

PREISKAVA BRISA SLUHOVODA

Bris sluhovoda vzamemo pri trdovratnih vnetjih sluhovoda in srednjega ušesa. Pacient pred preiskavo ne sme biti zdravljen z antibiotiki najmanj pet dni (odvisno od antibiotika). S to preiskavo determiniramo povzročitelja vnetja (bakterije, glivice), izdelamo čisto kulturo in antibiogram.

Za odvzem brisa potrebujemo sterilno vatirano palčko, ki jo pred uporabo namočimo v sterilno fiziološko raztopino. Nekdo mora psa dobro fiksirati, ker je vnetje ušes zelo boleče. Če ne gre drugače, damo psu pomirilo. Pred odvzemom moramo zunanji sluhovod zavrati tako, da potegnemo za uhelj navzgor in rahlo v stran. Nato gremo s pripravljeno vatirano palčko do notranjosti zunanjega sluhovoda in odvezemo bris z obračanjem palčke (obrnemo najmanj trikrat). Tako odvzet vzorec zapremo v sterilno embalažo in pošljemo v ustrezen laboratorij ali naredimo razmaz po postopku.

Material in inventar: bris zunanjega sluhovoda, predmetna stekelca, barvila po Gramu, Nigrosin (za dokazovanje gliv) ali Diff-Quik, mikroskop, krvni agar, inkubator.

NALOGA

1. Bris razmažite z enakomernim obračanjem po eni polovici predmetnega stekelca v 2–3 vrstah.
2. En preparat pobarvajte po Gramu ali z Diff-Quikovim barvilom po navodilu.
3. Drugi preparat pobarvajte z Nigrosinom. Po treh minutah sperite z destilirano vodo in posušite na zraku.
4. Nato bris nanesite še na krvni agar in inkubirajte 24 ur pri 37 °C.
5. Nadaljnji postopek je enak kot za vse mikrobiološke preiskave.

Izpeljite postopek, ugotovite povzročitelja in po potrebi izdelajte antibiogram.

PRIPRAVA CITOLOŠKIH PREPARATOV

Citološko diagnostiko v veterinarski praksi v zadnjih desetih letih vse bolj uporabljamo. Uspešnost te diagnostike je odvisna od ustreznega odvzema vzorca, priprave in barvanja preparata ter interpretacije. Veterinarski tehnik pomaga veterinarju pri odvzemu vzorca, zna pripraviti preparat za mikroskopiranje in ga ustrezno obarvati.

ODVZEM VZORCA IN VIVO

Priporoča se, da odvezamo vzorec živi živali (in vivo), ko je to le mogoče. S tem se izognemo operativnem posegu, kar ima veliko prednosti (tveganje anestezije, manjši stroški, manjša poškodba idr.). Najpogostejše tehnike odvzema vzorca so: tankoigelna punkcija, aspiracija skozi kateter, ostružek in bris površinskih sprememb.

TANKOIGELNA PUNKCIJA

S tankoigelno punkcijo lahko odvezamo vzorec za citološko preiskavo s katerega koli tkiva ali organa na površini ali v notranjosti telesa. Ves potreben material je manjša brizga (5–10 mL) in tanka igla (debeline 1,5 inča). Dolžina igle je odvisna od mesta odvzema in velikosti živali.

Mesto posega je potrebno obriti, razkužiti in pripraviti kot za manjši kirurški poseg. Potrebno je paziti na asepso pri posegu, da igla ostane sterilna, medtem ko kirurške rokavice in vse drugo kot pri kirurškem posegu ni potrebno. Splošna anestezija ali mirilo sta potrebna le, če imamo opravka z razburjeno in nemirno živaljo.

Iglo natakemo na brizgo in vbodemo v spremenjeno mesto, da lahko aspiriramo celice. Zaradi negativnega tlaka, ki se ustvari s potegom na bat brizge, se v iglo vsrkajo celice. Ta postopek je potrebno večkrat ponoviti tako, da ne izvlečemo igle na površino, ampak spreminjamo kot aspiracije. Po končani aspiraciji izvlečemo iglo iz telesa in jo snamemo z brizge. Zaradi negativnega tlaka se celice naberejo v lumnu igle. V brizgo aspiriramo zrak in ponovno natakemo iglo na brizgo. S pritiskom na bat izpihemo celice na eno ali več očiščenih predmetnih stekelc. Nadaljnja obdelava preparata je odvisna od odvzetega vzorca in tistega, ki bo interpretiral rezultat.

Torakocintezo (punkcijo prsnega koša) lahko opravimo na levi ali desni strani prsnega koša, običajno me 6. in 8. medrebrnim prostorom. Pri tem posegu je priporočljiva lokalna anestezija, ker lahko poškodujemo pljuča, če se žival premakne. Pogosto je potrebno odstraniti vso odvečno tekočino iz medpljučnega prostora, kar olajša dihanje, obenem pa dobimo vzorec za diagnostiko.

Vedno napolnimo dve epruveti s plevralno tekočino. Sterilno epruveto uporabimo za mikrobiološko preiskavo. V drugo epruveto, za citološko diagnostiko, damo ustrezno količino EDTA. Vzorec z EDTA uporabimo za oceno fizikalnih parametrov, kot so specifična teža, vsebnost beljakovin in štetje celic ter za pripravo citološkega preparata.

Pripravimo neposreden razmaz in razmaz sedimenta po centrifugiranju. Neposreden razmaz naredimo tako, da kapljico vzorca nanesimo na predmetno stekelce in jo razmažemo tako, kot delamo razmaz periferne krvi. Drugi preparat pripravimo tako, da vzorec centrifugiramo, odstranimo supernatant in s sedimentom naredimo razmaz tako kot s prejšnjim vzorcem. Pripravljene razmaze pustimo na zraku, da se posušijo in jih obarvamo tako, kot se pobarvajo krvni razmazi.

Abdominalno paracentezo (punkcijo trebušne votline) delamo pri stoječi živali. Iglo uvedemo tik pred popkom in rahlo na desno. Običajno ni potrebna ne lokalna ne splošna anestezija. Pri abdominalni paracentezi ni potrebno odstraniti vse tekočine, ker s tem ne dosežemo terapevtskega učinka tako kot pri prsni paracentezi. S tekočino, dobljeno iz trebušne votline, ravnamo enako kot s tekočino iz prsne votline.

ODVZEM VZORCA ZA VAGINALNO CITOLOGIJO

Poznamo številne tehnike odvzema vzorca za vaginalno citologijo, vendar se je še vedno odvzem enostavnega brisa izkazal kot zelo primeren.

Sterilnost je zelo pomembna pri odvzemu vzorca iz nožnice, da ne bi vnesli mikroorganizmov v rodila. Zunanje spolovilo je potrebno pripraviti tako kot za kirurški poseg. Sterilen vaginoskop uvedemo v nožnico in s sterilno vatrano palčko, predhodno namočeno v sterilno fiziološko raztopino, odvezamo vzorec, tako da podrgnemo po steni nožnice čim bližje cerviksu. Bris nanesimo na predmetno stekelce s tehniko obračanja po stekelcu v treh do štirih potezah, ne da bi se vračali nazaj z brisom (glej podrobnejši opis pri pripravi

mikroskopskih preparatov). Pripravljen razmaz pustimo na zraku, da se posuši in ga obarvamo tako, kot se pobarvajo krvni razmazi.

ODVZEM VZORCA IZ PROSTATE

Tako kot pri odvzemu vaginalnega brisa tudi pri odvzemu vzorca prostate poznamo več tehnik, vendar se je kot najboljša pokazala tehnika ročne masaže prostate.

Velikokrat ni potrebna anestezija živali. Urinski kateter (tanek, mehek, silikonski) skozi sečnico uvedemo do prostate, ki jo tipamo skozi rektum. Vrh katetra lahko tipamo skozi rektum, ko vstopa v prostato. Potrebno je paziti, da pri uvajanju katetra ne podmažemo preveč, ker lahko dodano vlažilno sredstvo moti interpretacijo rezultata.

Ko je kateter v prostati, na drugi konec katetra nastavimo brizgo. Ob rektalni masaži prostate in negativnem pritisku v brizgi lahko aspiriramo vsebnost prostate. Po končani aspiraciji popustimo pritisk v brizgi in izvlečemo kateter. Brizgo snamemo s katetra, jo napolnimo z zrakom in vsebino katetra izpihamo na pripravljena predmetna stekelca. Nadalje pripravimo preparat po tehniki stiskanca, opisani v nadaljevanju. Preparate posušimo na zraku in pobarvamo.

Vzorci, dobljeni s tehniko masaže prostate, imajo nekaj prednosti. Prostate med odvzemom vzorca ne spiramo s fiziološko raztopino. Izotonična raztopina lahko povzroči artefakte na citoloških preparatih in se ji, če je le mogoče, izognemo. Poleg tega vzorec, dobljen z masažo prostate, vsebuje samo celice, ki so lahko aspirirane iz prostate in ne tudi celic, ki bi jih fiziološka raztopina spotoma lahko sprala.

ODVZEM VZORCA IZ NOSNE VOTLINE

Citološki vzorec pri poškodbi nosne votline večinoma ni primeren za diagnostiko. Boljši način odvzema vzorca je tehnika izpiranja.

Pri odvzemu nazalnega vzorca je potrebno žival dati v splošno anestezijo in vstaviti endotrahealen tubus. Pacienta položimo na bok na kirurško mizo in z glavo navzdol. Nekaj mililitrov izotonične fiziološke raztopine vbrizgamo skozi urinski kateter (kateter za mačke) in aspiriramo. Aspirirano tekočino centrifugiramo in pripravimo razmaz sedimenta ter ga

pobarvamo. Če vzorec vsebuje večje delce, pripravimo mikroskopski preparat s tehniko stiskanca.

ODVZEM VZORCEV IZ SPODNJIH DELOV RESPIRATORNEGA TRAKTA

Vzorec iz spodnjih delov dihal prav tako dobimo s trahealno ali transtrahealno (skozi sapnik) izpiralno tehniko (lavažo). Transtrahealna lavaža je primerna za pse, konje in krave, za mačke pa ne. Živali so med posegom lahko budne.

Pri velikih živalih upogljiv sterilni kateter (I/V kateter) uvedemo skozi sapnik, kjer se obročki sapnika stikajo. Okoli 50 mL sterilne fiziološke raztopine apliciramo skozi kateter in takoj aspiriramo. Pri psih je tehnika odvzema podobna, le da kateter uvedemo skozi majhno vrezno rano na ventralni strani mehkega dela sapnika, ki jo omrtvičimo (lokalna anestezija). Dobljeni vzorec centrifugiramo in po prejšnjih navodilih naredimo mikroskopske preparate.

Endobronhialno lavažo naredimo v splošni anesteziji. Vzorec je lažje odvzeti z gibljivim bronhoskopom. Če ga nimamo, lahko vzorec dobimo tudi z mehkim plastičnim katetrom. Kateter ali bronhoskop uvedemo skozi sapnik vse do malih bronhijev, ki se razvejejo. Nato vbrizgamo fiziološko raztopino, aspiriramo in pripravimo mikroskopske preparate sedimenta.

ODVZEM VZORCA IN VITRO

Po odstranitvi tkiva lahko naredimo citološki preparat, da dobimo uporabne informacije, preden je narejena patohistološka diagnostika. Odstranjeno tkivo lahko obdelamo s tehniko tankoigelne puncije ali tehniko stiskanca. Drugi dve tehniki uporabimo pri izrezanem tkivu, in sicer lahko uporabimo tehniko vtiskanja ali ostružka.

TEHNIKA VTISKANJA

Držati se moramo treh pravil, da dobimo s to tehniko dober preparat:

1. Vedno uporabimo sveže odrezano površino tkiva, ki jo dobro posušimo z nekim dobro vpojnim materialom (filter papirjem, papirnatimi brisačami).
2. Odrezana površina mora biti majhna, ne večja od 1 cm².
3. Vedno naredimo več odtisov na eno predmetno stekelce.

Vtise tkiv naredimo tako, da se nežno dotaknemo pripravljenih predmetnih stekelc in dvignemo navpično navzgor, da ne razmažemo celic. Naredimo 2–3 vrste odtisov (skupaj 8–15) na eno predmetno stekelce. Uporabimo več stekelc (2–4) za eno odrezano površino. Preparate posušimo na zraku in ustrezno pobarvamo. Tudi če na stekelcu s prostim očesom ni videti celic, so taki odtisi primerni za citološko diagnostiko.

Vse odrezane površine niso primerne za pripravo odtisov. Tkivo, ki je sestavljeno iz epitelnih celic ali lepih okroglih celic, kot so bezgavke, vranica, tumorji idr., lahko uporabimo za to tehniko. Če pa izrezano tkivo vsebuje veliko vezivnega tkiva, ni primerno za pripravo takih preparatov. Takrat uporabimo tehniko odvzema ostružkov.

ODVZEM OSTRUŽKOV

Ostružek jemljemo s sveže odrezane površine tkiva z rezilom skalpela tako, da z rezilom drgnemo po površini. Ves odvzeti material, ki se je nabral na rezilu, nato nežno razmažemo po predmetnem stekelcu samo z enim potegom. Torej naredimo en razmaz v eno smer. Ne smemo se vračati, ker lahko poškodujemo celice. Preparat posušimo na zraku in ustrezno pobarvamo.

BARVANJE CITOLOŠKIH PREPARATOV

Pripravljene citološke preparate je potrebno ustrezno obarvati, preden jih diagnostik interpretira. Poznamo več tehnik barvanja. Najenostavnejše je barvanje z metilenskim modrilom, ki dobro obarva jedro, kar je primerno za diagnostiko malignosti. Slabost takega barvanja je v tem, da barvilo ni obstojno in preparata ne moremo uporabiti, ko želimo dobiti drugo mnenje (pošiljanje preparatov).

Drugi način barvanja po metodi Papanicolaou je enostaven in hiter. Ta način že dolgo uporabljajo v humani medicini, medtem ko v veterinarski medicine ne da vedno pričakovanih rezultatov. Potrebujemo le tekoči fiksator in nekaj raztopin različnih barvil. Največja pomanjkljivost tega načina barvanja je, da je manj primeren za barvanje mikroorganizmov. Zaradi teh razlogov ga za citologijo ne uporabljamo.

Primernejša so tista, ki jih uporabljamo za barvanje krvnega razmaza, npr.:

- Wrightovo barvanje

- Wright-Giemsovo barvanje
- Wright-Leishmannovo barvanje

V zadnjem času uporabljajo hitre in enostavne načine barvanja, ki so pravzaprav modificirani načini naštetih barvanj. Najbolj poznani so: Harleco's, Diff-Quick in Camco Quick Stain, ki so naredili revolucijo v veterinarski citološki diagnostiki.

Hematološka barvila imajo kar nekaj prednosti:

1. uporabljamo jih na zraku posušenih preparatih (toplota ne spremeni celice);
2. preparati so trajno pobarvani in so primerni za pošiljanje in shranjevanje;
3. dobro obarvajo tako citoplazmo kot jedro;
4. dobro pobarvajo mikroorganizme.

Pri barvanju preparatov za citološko diagnostiko se moramo držati določenih pravil. Preden preparate pobarvamo, jih ne smemo imeti v bližini formalina. Tudi formalinski hlapi motijo fiksacijo in samo barvanje preparatov. Če pošiljamo nepobarvane preparate na diagnostiko, jih ne smemo pakirati skupaj s preparati, fiksiranimi v formalinu. Če pošiljamo preparate na barvanje z običajnimi hematološkimi barvili, jih ne smemo pred tem fiksirati v alkoholu. V alkoholu jih lahko fiksiramo samo tik pred celotnim barvanjem.

Barve shranjujemo pri sobni temperaturi v temnem prostoru in preprečimo izhlapevanje. Uporabljamo jih lahko le do roka, napisanega na embalaži.

Za hitro obarvanje laboratorijskih preparatov običajno uporabljamo barvila tipa Romanowsky (pankromatična). Preparate vedno pustimo, da se posušijo na zraku. Pobarvamo jih po navodilu proizvajalca. Pri teh barvilih najprej preparat za 3 sekunde namočimo v fiksator (trikrat namočimo po eno sekundo). Postopek ponovimo z obema barviloma. Nato obilno speremo z destilirano vodo, pri čemer pazimo, da curek vode ne usmerimo neposredno na razmaz. Preparat postavimo navpično na vpojno podlago in posušimo na zraku.

TEHNIKE PRIPRAVE CITOLOŠKIH VZORCEV

ENOSTAVEN RAZMAZ

Enostaven razmaz je primeren za pripravo preparatov iz tekočih vzorcev, kot so: kri, punktati iz telesnih votlin (prsne in trebušne votline, mehurja, hrbteničnega kanala). Če vzorec vsebuje veliko tekočine, jo je potrebno najprej centrifugirati in narediti razmaz iz sedimenta.

NALOGA

Naredite enostaven krvni razmaz in razmaz iz punktata iz trebušne votline.

Material in inventar: vzorec periferne polne krvi, vzorec punktata trebušne votline, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, centrifuga, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Vzorec krvi narahlo premešajte.
4. S hematokritsko cevčico zajemite kapljico krvi in jo kanite na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.
5. Drugo predmetno stekelce postavite pred kapljico krvi tako, da je nagnjena proti kapljici krvi za približno 30–45°.
6. Približajte zgornje stekelce kapljici in počakajte, da se kri razlije po robu.
7. Potegnite zgornje stekelce v nasprotno smer, da naredite enakomeren razmaz.
8. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.
9. Punktat trebušne votline prelijte v centrifugirko ali koničasto epruveto.
10. Centrifugirajte 5 minut pri 2.000 obratih.
11. Pazljivo odlijte supernatant.
12. Preostali sediment premešajte z rahlim stresanjem centrifugirke.

13. S hematokritsko cevčico zajemite kapljico zmesi in jo kanite na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.

14. Nadaljujte po točkah 5–8.

Tako pripravljena vzorca sta primerna za takojšnjo interpretacijo, shranjevanje ali pošiljanje.

NAJPOGOSTEJŠE NAPAKE:

- prevelika kapljica krvi – nastane predebel razmaz;
- nerazmaščeno predmetno stekelce – nastanejo prazni prostori na razmazu;
- neenakomerno drsenje z zgornjim predmetnim stekelcem – nastanejo “valovi” na razmazu;
- prevelik pritisk, manjši kot med predmetnima stekelcema – nastane neenakomeren razmaz.

LINEARNI (ČRTNI) RAZMAZ

Ta način uporabljamo za tekoče vzorce, ki vsebujejo majhno število celic (likvor, urin) in v katerih najpogosteje iščemo parazite in rakaste celice.

NALOGA

Naredite linearni razmaz iz vzorca urina.

Material in inventar: vzorec urina, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, centrifuga, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Vzorec urina prelijte v centrifugirko ali koničasto epruveto.
4. Centrifugirajte 5 minut pri 2.000 obratih.
5. Pazljivo odlijte supernatant.
6. Preostali sediment premešajte z rahlim stresanjem centrifugirke.

7. S hematokritsko cevčico zajemite kapljico urina in jo kanite na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.
8. Drugo predmetno stekelce postavite pred kapljico krvi tako, da je nagnjena proti kapljici krvi za približno 30°.
9. Približajte zgornje stekelce kapljici in počakajte, da se urin razlije po robu.
10. Potegnite zgornje stekelce v nasprotno smer do polovice predmetnega stekelca.
11. Naglo dvignite zgornje stekelce pod pravim kotom tako, da ostane večji del tekočine zbran na tem mestu.
12. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Tako pripravljen razmaz vsebuje največje število celic oz. največje delce (celice, jajčeca) prav na mestu, kjer smo končali razmaz.

DEBELOPLASTNI RAZMAZ

Debeloplastni razmaz uporabljamo za kri ali tekočine, ki vsebujejo kri, za iskanje krvnih parazitov ali rakastih celic. Tak razmaz je gostejši od enostavnega linearnega razmaza, je tehnično zahtevnejši, ker potrebujemo mikrohematokritsko centrifugo, in je primeren, ko imamo manjše količine vzorca.

NALOGA

Naredite debeloplastni krvni razmaz.

Material in inventar: vzorec periferne polne krvi, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, hematokritska centrifuga, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Vzorec krvi narahlo premešajte.
4. Napolnite hematokritsko cevčico s krvjo in centrifugirajte 3 minute pri 3.000 obratih.

5. Po centrifugiranju odrežite spodnji del cevčice in kanite kapljico krvi na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.
6. Drugo predmetno stekelce postavite pred kapljico krvi tako, da je nagnjena proti kapljici krvi za približno 45°.
7. Približajte zgornje stekelce kapljici in počakajte, da se kri razlije po robu.
8. Potegnite zgornje stekelce v nasprotno smer, da naredite enakomeren razmaz.
9. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

PRIPRAVA RAZMAZOV IZ CENTRIFUGIRANIH VZORCEV

Vzorci centrifugiramo, kadar imamo opravka s tekočinami, v katerih pričakujemo majhno število celic ali pa je vzorca zelo malo. Sedimentu dodamo par kapljic plazme pacienta, ki smo mu odvzeli vzorec, da ohranimo morfologijo celic.

NALOGA

Naredite enostaven razmaz iz urinskega sedimenta.

Material in inventar: vzorec urina, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, centrifuga, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Vzorec urina narahlo premešajte in prelijte v centrifugirko ali koničasto epruveto.
4. Centrifugirajte 5 minut pri 2.000 obratih.
5. Pazljivo odlijte supernatant in dodajte 2–3 kapljice krvne plazme.
6. Vzorec premešajte z rahlim stresanjem centrifugirke.
7. S hematokritsko cevčico zajemite kapljico zmesi in jo kanite na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.
8. Drugo predmetno stekelce postavite pred kapljico vzorca tako, da je nagnjena proti kapljici za približno 30°.

9. Približajte zgornje stekelce kapljici in počakajte, da se vzorec razlije po robu.
10. Potegnite zgornje stekelce v nasprotno smer, da naredite enakomeren razmaz.
11. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Če je v vzorcu še vedno premalo celic, lahko naredimo linearni razmaz.

ZVEZDASTO RAZMAZOVANJE

Ta način razmaza je uporaben za zelo vlečljive mukozne vzorce.

NALOGA

Naredite zvezdast razmaz iz mukoznega nosnega izcedka.

Material in inventar: vzorec nosnega izcedka, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, injekcijska igla, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Kapljico nosnega izcedka kanite na sredino predmetnega stekelca.
4. Razpršite vzorec z injekcijsko iglo od središča navzven (zvezdasto).
5. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Preglejte preparat od začetka krakov zvezde proti sredini. Na krakih je najmanjša koncentracija celic.

PRIPRAVA PREPARATOV IZ BRISA

Ta način priprave uporabljamo za nazalne, faringealne, vaginalne in druge brise. Pri jemanju brisa upoštevamo vsa načela asepse, da ne bi prišlo do okužbe pacienta ali kontaminacije vzorca. Pred jemanjem brisa navlažimo vatirano palčko s fiziološko tekočino.

NALOGA

Naredite razmaz na predmetno stekelce iz vaginalnega brisa.

Material in inventar: vaginalni bris, predmetna stekelca, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Bris nanesite na predmetno stekelce z enakomernim obračanjem do 2/3 stekelca.
4. Na eno predmetno stekelce nanesite več vzporednih brisov.
5. Pri nanašanju pazite, da se ne vračate z brisom v nasprotno smer.
6. Posušite razmaz na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Iz enega brisa lahko nanesete vzorec na 2–3 stekelca; na eno stekelce naredimo običajno tri vrstice razmazov.

PRIPRAVA PREPARATA STISNJENCA

To je najprimernejša tehnika za evalvacijo vzorcev, dobljenih s tankoigelno punkcijo.

NALOGA

Pripravite mikroskopski preparat za citološko evalvacijo s tehniko stisnjenca.

Material in inventar: tankoigelni punktator bezgavk, predmetna stekelca, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Punktator z enim ali večkratnim izpihovanjem nanesite na predmetno stekelce.
4. Drugo predmetno stekelce postavite na prvega pod kotom 90° in potegnite vzporedno s spodnjim predmetnim stekelcem.
5. Spodnje predmetno stekelce nežno odstranite in pazite, ker se ustvari podtlak (zlepita se).
6. Razmaz posušite na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

PRIPRAVA PREPARATA – ODTIS

Odtise tkiv za citološko diagnostiko naredimo neposredno po odvzemu tkiva, ki je sicer namenjeno za patohistološko analizo.

Material in inventar: tkivo neposredno po odvzemu velikosti do 1 cm² ali malo večje, skalpel, pinceta, predmetna stekelca, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

NALOGA

Naredite mikroskopski preparat za citološko diagnostiko s tehniko odtisa.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Tkivo takoj po odvzemu fiksirajte s pinceto in odrezano površino položite na vpojno podlago, dokler ni po videzu suha. Če imate večji kos tkiva, odrežite s skalpelom primeren košček in postopek ponovite.
4. Z odrezano površino se na rahlo dotikajte predmetnega stekelca v več zaporednih odtisih in v dveh ali treh vrstah.
5. Enako lahko ponovite na novem predmetnem stekelcu.
6. Razmaz posušite na zraku in ga pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Pri pripravi preparata z odtisom tkiv je pomembno, da je površina reza majhna in skoraj suha. Z enim vzorcem moramo narediti vsaj 8 odtisov. Tkivo s stekelca dvigujemo pod pravim kotom, da ne bi nastal razmaz.

PRIPRAVA MIKROSKOPSKEGA PREPARATA – OSTRUŽEK

Ostružek je smiselno narediti, ko ugotovimo, da neposrednega odtisa ne moremo narediti, ker tkivo vsebuje veliko veziva in bi se celice pri odtisu umaknile v notranjost, ali če se tkivo nahaja na mestu, kjer bi s punkcijo lahko pričakovali slabe rezultate, ali če je novotvorbo težko ločiti od tkiva (fibrosarkom). Ostružek naredimo tudi, če lahko uporabimo samo zgornjo stran novotvorbe (površino).

Material in inventar: vzorec tkiva na rezilu skalpela, dobljen z drgnjenjem skalpela po površini (ostružek), predmetna stekelca, Diff-Quickova barvila, alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

NALOGA

Naredite mikroskopski preparat ostružka za citološko diagnostiko.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Ostružek takoj po odvzemu v tankem enojnem potegu nanesite na predmetno stekelce.
4. Preostali vzorec lahko nanesete na drugo predmetno stekelce in s tretjim stekelcem vzorec narahlo razmažete.
5. Razmaza posušite na zraku in ju pobarvajte z Diff-Quickovimi barvili.

Pri nanašanju ostružka s skalpelom po predmetnem stekelcu pazite, da nanesete vzorec samo v eno smer (z rezilom skalpela ne smete potegniti v nasprotno smer že nanesenega preparata).

PRIPRAVA MIKROSKOPSKEGA PREPARATA – RETIKULOCITI

Retikulociti so nezreli eritrociti, ki vsebujejo ostanke ribosomalne RNK (vidne s posebnim barvanjem).

Podatek o številu retikulocitov v periferni krvi potrebujemo za oceno eritropoetične dejavnosti kostnega mozga pri psih, mačkah in glodavcih oz. za določanje regenerativne oz. degenerativne anemije.

Vzorec krvi vzamemo 3–5 dni po akutni izgubi krvi.

Material in inventar: vzorec periferne polne krvi, hematokritske cevčice, predmetna stekelca, centrifuga, barvilo za retikulocite (metilensko modro), alkoholni flomaster, alkohol, papirnate brisače.

NALOGA

Naredite enostaven krvni razmaz za ugotovitev števila retikulocitov.

1. Razmastite predmetna stekelca z alkoholom in jih posušite.
2. Predmetna stekelca označite.
3. Vzorec krvi narahlo premešajte.
4. Nekaj kapljic krvi prenesite v drugo epruveto in dodajte enako količino metilenskega modrila.
5. Narahlo premešajte in pustite vzorec na sobni temperaturi 15–20 minut.
6. Vzorec ponovno premešajte in s hematokritsko cevčico zajemite kapljico vzorca in jo kanite na spodnjo tretjino predmetnega stekelca.
7. Drugo predmetno stekelce postavite pred kapljico vzorca tako, da je nagnjena proti kapljici krvi za približno 45°.
8. Približajte zgornje stekelce kapljici in počakajte, da se vzorec razlije po robu.
9. Potegnite zgornje stekelce v nasprotno smer, da naredite enakomeren razmaz.
10. Posušite razmaz na zraku.

Tako pripravljen razmaz je primeren za shranjevanje ali takojšnjo evalvacijo. Preparat pregledujemo pod 1000-kratno povečavo. Če hočemo določiti, koliko je retikulocitov v periferni krvi, moramo prešteti, koliko je retikulocitov na 1000 eritrocitov.

Vrednost Rtc (retikulocitov) določimo v % ali absolutnem številu.

Povprečne vrednosti:

PES: $28-80 \times 10^9/L < 1,0 \%$

MAČKA: $28-100 \times 10^9/L < 0,4 \%$

SHRANJEVANJE IN POŠILJANJE CITOLOŠKIH PREPARATOV

Vsak preparat mora biti označen z datumom, imenom ali s številko pacienta, stranjo preparata oz. označeno mora biti, ali si preparati sledijo. Na preparate lahko pišemo z alkoholnim flomastrom, s posebnim pisalom za steklo, z navadnim svinčnikom na brušen del predmetnega stekelca ali uporabimo posebne nalepke.

Preparate pustimo, da se posušijo na zraku brez krovne stekelca. Sušenja ne smemo pospeševati (npr. s sušilnikom ali ob ognju), ker lahko toplota poškoduje celice. Krovno stekelce nudi zaščito pred prahom, vendar ga za citološke preparate ne uporabljamo.

Posušenih preparatov ne smemo ponovno izpostaviti vlagi (npr. shranjevati v hladilniku).

Preparate, ki niso fiksirani, lahko shranimo za nekaj dni, nato jih moramo fiksirati vsaj v metanolu. Za citološke preiskave preparatov ne fiksiramo z ognjem. Tega lahko uporabimo samo za mikrobiološke preparate.

Za pošiljanje mikroskopskih preparatov uporabljamo posebne mape ali škatle, v katerih lahko preparate tudi shranjujemo. Vedno jih pošiljamo skupaj s spremnim dopisom, ki mora poleg osnovnih podatkov vsebovati tudi: anamnezo, podatke o odvzemu vzorca in klinično sliko živali. Nikoli jih ne dajemo v bližino formalina ali vzorcev v formalinu. To se zelo pogosto zgodi, ko delamo odtise tkiv in preostanek tkiv shranjujemo v 10 % formalinu, ki ga nato pošljemo na patohistološko analizo.

NAJPOGOSTEJŠE NAPAKE

- Predmetna stekelca se rada zlepijo.
- Nanos vzorca je predebel (npr. premalo stisnjen).
- Vzorec ostane predolgo v igli ali je celo na tak način poslan na nadaljnjo analizo.
- Preparati so pred pošiljanjem shranjeni na ledu.
- Vzorci so poslani na neočiščenih predmetnih stekelcih.
- Preparati niso označeni ali so podatki zabrisani.

LITERATURA

1. Henrix, M. C. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*. ZDA: Mashy 2002.
2. Pivk, B. *Laboratorijska hematologija*. Velike Lašče: Elanda, 2003.