

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

Утверждаю
директор института

С.В. Балахонов

«20» февраля 2025 г.

**Методы микроскопии
в лабораторной диагностике
опасных инфекционных болезней**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ,
ЛАБОРАНТОВ

ИРКУТСК
2025

УДК 005.1
ББК 65. 9920

Авторы-составители:

Старикова О.А., Загоскина Т.Ю., Долгова Т.М., Колесникова О.Б.,
Гаврилова О.В., Старовойтова Т.П., Смольников Ю.Н.

Методы микроскопии в лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней. Учебно-методическое пособие. – Иркутск, 2025. – 68 с.

ISBN 978–5–6054556–4–6

В учебно-методическом пособии описаны основные типы биологических микроскопов, характеристики светового (оптического), люминесцирующего и электронного микроскопов, включая их разновидности, устройство, алгоритм работы, уход за микроскопами, охарактеризованы методы микроскопии, используемые красители, методики приготовления и окрашивания микроскопических препаратов. Проанализированы причины ошибок при проведении микроскопических исследований. Разработано два практических занятия по приготовлению красок и окрашиванию мазков несколькими способами.

Учебное пособие предназначено для обучения слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по программам ДПО, оно может быть также использовано широким кругом специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой опасных инфекционных болезней.

Рецензенты:

Т.А.Иванова – заведующая лаборатории экспериментальных животных
С.А.Белькова – заведующая коллекции патогенных бактерий, к.б.н.

Содержание

Введение	4
Основные типы биологических микроскопов.....	4
Световой (оптический) микроскоп и его разновидности.....	6
Типы электронных микроскопов.....	13
Класс микроскопов	17
Устройство микроскопов.....	17
Алгоритм работы со световым микроскопом	20
Алгоритм работы с люминесцентным микроскопом	21
Уход за микроскопом	24
Методы микроскопии	25
Морфология бактерий. Основные формы бактерий.....	34
Техника безопасности при работе с диагностическим материалом.....	35
Методы приготовления и окрашивания микроскопических препаратов	36
Оборудование рабочего места для окраски мазков.....	41
Подготовка предметных и покровных стёкол.....	42
Причины ошибок при микроскопических исследованиях.....	42
Красители для бактериоскопии	43
Способы окраски микроскопических препаратов	45
Чистая культура. Окраска по Граму.....	47
Методы окраски	47
Занятие № 1	52
Занятие № 2	53
Приложение	54
Список используемой литературы	67

Введение

Учебное пособие предназначено для приобретения необходимых практических навыков и знаний по применению микроскопических методов исследования, используемых в ходе освоения слушателями программ профессиональной переподготовки и повышения квалификации.

В пособии представлены материалы о современных микроскопах, используемых красителях, простых и сложных методах окраски, позволяющих не только изучать тинкториальные и морфологические свойства микроорганизмов, но и их способность к движению, образованию спор и капсул. Наряду с освоением теоретических знаний по микроскопии, уделено внимание лабораторно-практическим занятиям, позволяющим слушателям повысить профессиональные знания и навыки в работе по микроскопии.

Использование эффективных методов микроскопии определяют основы микробиологии, как одного из разделов биологической науки. Специфика микроскопии, обусловленная сложностью аппаратуры и своеобразием объекта, требует определенной квалификации исследователя для получения надёжных результатов и правильного их толкования. Умелый выбор прибора, понимание явлений, имеющих место в микроскопии, способствуют получению достоверных результатов. При этом следует учитывать, что нельзя добиться достоверных результатов при неправильной настройке микроскопа и небрежной подготовке препаратов.

В предлагаемом учебно-методическом пособии сконцентрированы необходимые сведения по микроскопии. Большое внимание уделено световой микроскопии, которая является наиболее востребованной в микробиологической практике.

Приведены правила работы с микроскопом и ухода за ним, описаны основные принципы и приёмы различных методов микроскопии, их недостатки и преимущества.

Основные типы биологических микроскопов

Тип микроскопа определяется конструкцией прибора, его оснащением и характеристиками основных узлов, областью применения, характером объектов, методами исследования. Существует большое разнообразие различных типов микроскопов.

Оптический (световой) микроскоп – представляет собой тип микроскопа, который обычно использует видимый свет и систему линз для получения увеличенных изображений небольших объектов. Базовые оптические микроскопы могут быть очень простыми, но чем сложнее конструкция, тем выше разрешающая способность и контрастность образца.

Оптические микроскопы различаются по видам и модификациям для разнообразных областей применения.

В последние десятилетия для микроскопических исследований широко применяется специальное оптическое программное обеспечение. С помощью компьютерных программ достигается непрерывное наблюдение за объектами исследований, что особенно важно для изучения биологических объектов. Благодаря современным алгоритмам, применяемым в оптическом программном обеспечении, значительно сокращаются затраты рабочего времени.

Электронный микроскоп является более совершенной конструкцией. Он обеспечивает увеличение изображения как минимум в 20 000 раз. Максимальное увеличение подобного прибора возможно в 10^6 раз. Особенность этого оборудования заключается в том, что вместо луча света, как у оптических, в электронном микроскопе направляется пучок электронов. Получение изображения осуществляется благодаря применению специальных магнитных линз, которые реагируют на движение электронов в колонне прибора. Регулировка направленности пучка осуществляется с помощью магнитного поля.

Электронные устройства при всех своих достоинствах имеют ряд недостатков: сложная подготовка и отсутствие возможности просмотра больших образцов, специальные требования для места расположения (развязанный фундамент, виброзащита и т. д.), высокий вакуум (10^{-8} – 10^{-11} Торр) и стоимость прибора, сложность в техническом обслуживании. Чтобы получать качественное четкое изображение необходимо, чтобы предмет изучения находился в вакууме. Это связано с тем, что молекулы воздуха рассеивают электроны, что нарушает четкость изображения и не позволяет проводить точную регулировку. Также важным требованием для использования электронных микроскопов является отсутствие внешних магнитных полей. В связи с этим лаборатории, в которых их используют, имеют очень толстые изолированные стены или находятся в подземных бункерах.

Подобное оборудование используется в медицине, биологии, а также в различных отраслях промышленности.

Сканирующий зондовый микроскоп позволяет получать изображение с объекта путём его исследования с помощью специального зонда. В результате получается трехмерное изображение с точными данными характеристики объектов. Это сравнительно новое оборудование, которое создали несколько десятков лет назад, имеющее высокое разрешение. Вместо объектива данные приборы оснащены зондом и системой его перемещения. Получаемое изображение регистрируется сложной системой и записывается, после чего создаётся топографическая картина увеличенных объектов. Зонд оснащается чувствительными сенсорами, которые реагируют на движение электронов. Также встречаются зонды, которые работают по оптическому типу путём увеличения, связанного с установкой линз.

Для данного метода характерна значительная погрешность измерения, поскольку получаемая в результате 3D картина сложно поддается расшифровке. Присутствует много деталей, которые искажаются компьютером при обработке. Первоначальные данные обрабатываются математическим способом с помощью специализированного программного обеспечения.

Рентгеновский микроскоп относится к лабораторному оборудованию, применяемому для изучения объектов, размеры которых сопоставимы с длиной рентгеновской волны. Эффективность увеличения данного устройства находится между оптическими и электронными приборами. На изучаемый объект отправляются рентгеновские лучи, после чего чувствительные датчики реагируют на их преломление. В результате создаётся картинка поверхности изучаемого объекта. Благодаря тому, что рентгеновские лучи могут проходить сквозь поверхность предмета, подобное оборудование позволяет не только получить данные о структуре объекта, но и его химическом составе.

Рентгеновское оборудование обычно используется для оценки качества тонких покрытий. Его используют в биологии и ботанике, а также для анализа порошковых смесей и металлов.

Световой (оптический) микроскоп и его разновидности

Микроскопы широко используются в самых разных отраслях промышленности, в области образования и науки, для проведения экспертиз. В зависимости от своего предназначения и конструктивных особенностей световые микроскопы подразделяются на металлогра-

фические, биологические, криминалистические, люминесцентные, поляризационные, инвертированные, стереомикроскопы и моновидеомикроскопы.

Биологические микроскопы

Их также называют лабораторными, медицинскими, микроскопами проходящего света и плоского поля. Их предназначение – изучение прозрачных и полупрозрачных объектов.

Лабораторные микроскопы особенно широко применяются в различных областях биологии (ботанике, микробиологии, цитологии) и медицины, а также – в археологии, микроэлектронике, пищевой промышленности, геологии и т. д. Подобные устройства могут оснащаться или дополнительно комплектоваться специальными аксессуарами, насадками, светофильтрами, наборами объективов и окуляров, цифровыми фото- и видеокамерами.

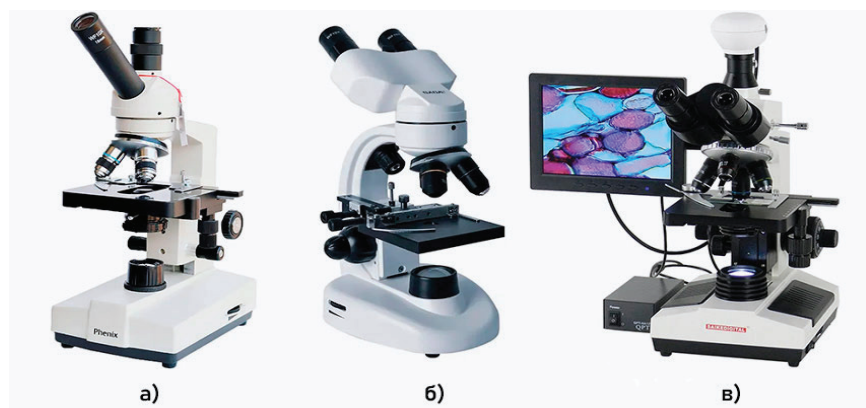


Рис. 1 Разновидность биологических микроскопов
МБР-1, МБР-3, дорожный МБД-1, «Биолам 270»,
МББ-1А, МБИ-6, МБИ-11, МБИ-15
(<https://microscopestorenyс.com>)

Люминесцентные микроскопы

Люминесцентный микроскоп снабжен мощным источником освещения с большой поверхностной яркостью, максимум излучения которого находится в коротковолновой области видимого спектра, системой светофильтров, а также интерференционной светоделительной пластинкой, применяемой при возбуждении люминесцен-

ции падающим светом. В современных люминесцентных микроскопах применяются специальные флюоресцирующие или ферментные метки, за счёт чего удаётся существенно уменьшить размеры оборудования.

Люминесцентный микроскоп незаменим в биологии, медицине, а также смежных областях. Он позволяет проводить точные исследования клеток и тканей организмов. Главным преимуществом люминесцентной микроскопии считается возможность увидеть образец изнутри. Остальные приборы изучают лишь поверхность объекта.



Рис. 2 Люминесцентный микроскоп Микромед-3 ЛЮМ
(<https://www.piterlab.ru>)

Стереомикроскопы

Стереомикроскопы позволяют получать объёмное изображение исследуемого объекта за счёт наличия у него не одного, а сразу двух объективов, расположенных под углом. Стереомикроскопы обладают существенно большей глубиной резкости по сравнению с обычными микроскопами плоского поля. За счёт наличия таких свойств подобные устройства могут эффективно использоваться в ряде областей промышленности, к примеру, – в ювелирном деле. Помимо стандартных стереомикроскопов, получили распространение и цифровые модели.



Рис. 3 Стереомикроскоп SZX7
(<https://itglobe.ru>)

Криминалистические микроскопы

Криминалистические микроскопы предназначены для одновременного сравнительного анализа двух объектов. Подобные экспертизы позволяют выявить идентичность таких предметов, как волосы, гильзы, пули, волокна, нитки, ткани и пр. Для исключения возможных ошибок сегодня широко применяется дополнительное цифровое оборудование и программное обеспечение. Криминалистические микроскопы могут использоваться в комплексе с фото- и видеокамерами и персональными компьютерами.



Рис. 4 Криминалистический микроскоп БИОМЕД МСК-1
(<https://www.hinotek.com>)

Металлографические микроскопы

Металлографические микроскопы предназначены для изучения структуры поверхности непрозрачных материалов, в первую очередь металлов и сплавов. Подобные исследования производятся в отраженном свете. Для получения желаемого эффекта используются специальные системы линз и зеркал. Металлографические микроскопы по своей конструкции могут быть прямыми или инвертированными, а также портативными. Наиболее эффективными являются современные цифровые модели, позволяющие производить максимально точные исследования поверхности изучаемых объектов.

Подобные приборы применяются в металлургии, машиностроении, археологии, геологии и т.д.



Рис. 5 Металлографический микроскоп RX50
(<https://velmas.ru>)

Поляризационные микроскопы

Поляризационные микроскопы относятся к наиболее сложным в технологическом плане типам оптического оборудования. Они используются для исследования материалов, обладающих нестандартными (анизотропными) оптико-кристаллическими свойствами. В процессе работы формируется поляризованный световой поток, который облучает изучаемый образец.

Поляризованные микроскопы наиболее широко применяются в минералогии, кристаллографии, петрографии (изучение горных пород), а также при проведении гематологических, гистологических и других медицинских и микробиологических исследований.



Рис. 6 Поляризационный микроскоп OPTO-EDUA15.2601
(<https://velmas.ru>)

Инвертированные микроскопы

Инвертированные микроскопы отличаются тем, что их объективы находятся под исследуемым предметом. Это позволяет работать с достаточно большими по своему объёму объектами, а также использовать специальную лабораторную посуду и инструменты. При этом инвертированные микроскопы могут быть биологическими, люминесцентными, металлографическими и пр.

Подобные приборы широко используются при различных научных и лабораторных исследованиях в микробиологии, медицине, машиностроении, микроэлектронике и т.д.



Рис. 7 Люминесцентный инвертированный микроскоп LeicaDMi
(<https://www.vseinstrumenti.ru>)

Моновидеомикроскопы

Моновидеомикроскопы предназначены для получения видеоизображения наблюдаемых объектов с возможностью вывода на экран, записи и последующего анализа информации. При этом конструктивно устройство является объективом для камеры. Для эффективной работы моновидеомикроскопы можно дополнительно комплектовать необходимыми аксессуарами (предметными столами, линзами, фильтрами, осветителями, адаптерами).



Рис. 8 Моновидеомикроскоп Альтами MB0670СПД
(<https://planetarium.ru>)

Конфокальный микроскоп

Это разновидность светового оптического микроскопа, обладающего значительным контрастным пространственным разрешением по сравнению с классическим световым микроскопом, что достигается использованием точечной диафрагмы (пинхол, pinhole), размещённой в плоскости изображения и ограничивающей поток фонового рассеянного света, излучаемого не из фокальной плоскости объектива. Это позволяет получить серии изображений на различных глубинах фокальной плоскости внутри образца (т.е. оптическое секционирование образца по глубине) и затем реконструировать трехмерное изображение образца из этих серий. Конфокальный микроскоп получил широкое применение в области биологии, медицины, материаловедения и физике полупроводников.



Рис. 9 Конфокальный микроскоп Nikon AX / AX R
(<https://modasadovod.ru>)

Типы электронных микроскопов

Просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ)

Отличается от других типов электронных микроскопов тем, что электронный пучок просвечивает образец, неоднородное поглощение электронов разными участками образца даёт двумерную картину распределения плотности прошедшего электронного потока. Прошедший через образец поток затем фокусируется на регистрирующей поверхности магнитными электронными линзами (электронной оптикой) в увеличенном размере. В качестве регистрирующей поверхности применяют флуоресцентные экраны, покрытые слоем люминофора, фотоплёнку или фотопластинку, или приборы с зарядовой связью (на ПЗС-матрице). Например, на слое люминофора образуется светящееся видимое изображение.

Так как поток электронов сильно поглощается веществом, изучаемые образцы должны иметь очень маленькую толщину, так называемые ультратонкие образцы. Ультратонким считается образец толщиной менее 0,1 мкм.



**Рис. 10 Просвечивающий электронный микроскоп
Jeol JEM-1400Flash**
(<https://cdn.prod.website-files.com>)

Просвечивающий растровый (сканирующий) электронный микроскоп (ПРЭМ)

Как и в любой просвечивающей схеме освещения электроны проходят через весьма тонкий образец. Однако, в отличие от традиционной ПЭМ, в ПРЭМ электронный пучок фокусируется в точку, которой проводят растровое сканирование.

Обычно ПРЭМ – это традиционный просвечивающий электронный микроскоп, оснащённый дополнительными сканирующими линзами, детекторами и необходимыми схемами, вместе с тем существуют и специализированные ПРЭМ приборы.



Рис. 11 NT-120F – просвечивающий электронный микроскоп
(<https://new-tons.ru/wp-content/uploads/nt-120f.png>)

Растровый (сканирующий) электронный микроскоп (РЭМ)

Предназначенный для получения изображения поверхности объекта с высоким (до 0,4 нанометра) пространственным разрешением, также информации о составе, строении и некоторых других свойствах приповерхностных слоёв. Основан на принципе взаимодействия электронного пучка с исследуемым объектом.

Современный РЭМ позволяет работать в широком диапазоне увеличений приблизительно от 3–10 раз (т.е. эквивалентно увеличению сильной ручной линзы) до 1 000 000 раз, что приблизительно в 500 раз превышает предел увеличения лучших оптических микроскопов.

Сегодня возможности растровой электронной микроскопии используются практически во всех областях науки и промышленности, от биологии до наук о материалах. Существует огромное число выпускаемых рядом фирм разнообразных конструкций и типов РЭМ, оснащённых детекторами различных типов.



**Рис. 12 Сканирующий настольный электронный микроскоп
SEC SNE-4500 Plus**
(<https://www.microsystemy.ru>)

Криоэлектронный микроскоп

Суть криоэлектронной микроскопии – изучение в электронном микроскопе замороженных образцов. Воздействие высокой температуры в криоэлектронном микроскопе нивелируется охлаждением образца жидким азотом, а проблема кристаллизации воды при замораживании решается быстрым её охлаждением, при котором переход в стеклообразное (витрифицированное) состояние осуществляется, минуя фазу кристаллизации. Такая вода не только предохраняет образец от разрушения в вакууме, но и не рассеивает электроны.

Первоначально криоэлектронную микроскопию намеревались ис-

пользовать как средство борьбы с радиационным повреждением биологических образцов. Количество излучения, необходимое для сбора изображения образца в электронном микроскопе, достаточно велико, чтобы стать потенциальным источником повреждения образца для деликатных структур.



**Рис. 13 TundraCryo-TEM – криоэлектронный микроскоп
ThermoScientific (technoinfo.ru)**

Атомно-силовой микроскоп (АСМ, англ. вариант AFM – atomic force microscope) сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) высокого разрешения. Используется для определения рельефа поверхностей как проводящих, так и непроводящих образцов (в отличие от туннельного микроскопа) с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного, кроме этого позволяет манипулировать отдельными атомами. Ввиду его способности получать данные по силовому воздействию на кантилевер (датчик силового взаимодействия), он назван силовым.



**Рис. 14 Атомно-силовой микроскоп AFM2000
(<https://www.microsystemy.ru>)**

Класс микроскопов

Класс микроскопа – это важный параметр, который определяет возможности и точность микроскопа. Существует четыре класса микроскопов:

Класс I – это самые простые и недорогие микроскопы, предназначенные для общего наблюдения. Они могут увеличивать объекты от 40 до 1000 раз, но не имеют регулировки освещения или фокуса.

Класс II – эти микроскопы обладают регулировкой освещения и фокуса, а также могут увеличивать объекты до 1500 раз. Они подходят для детального изучения объектов.

Класс III – это профессиональные микроскопы для лабораторных исследований и медицинских учреждений. Они обеспечивают увеличение от 400 до 2000 раз и больше, имеют регулировку контраста и освещения, а также другие параметры.

Класс IV – это самые точные и дорогие микроскопы для молекулярной биологии и других специализированных исследований. Они могут увеличить объекты до 50 000 раз и выше.

При выборе микроскопа важно учитывать свои потребности и цели. Для начинающих исследователей подойдут микроскопы классов I или II, а для профессиональных исследований – классов III или IV.

Устройство микроскопов

С помощью микроскопа определяют форму, размеры, строение и многие другие характеристики объектов, но для этого, прежде всего, необходимо научиться правильно им пользоваться.

Микроскоп – важнейший прибор, без которого не обойтись при проведении научных и лабораторных исследований. Современный оптический микроскоп является наиболее популярным как среди любителей, так и профессионалов, так как с его помощью можно решить множество простых исследовательских задач.

Главными компонентами микроскопа являются: окуляр, объектив, конденсор, предметный столик и осветитель.

В микроскопе выделяют оптическую и механическую части.

К оптической части относятся:

- **окуляр** – это та часть микроскопа, которая прямо связана с глазами наблюдателя. В самых первых микроскопах он состоял из одной линзы; конструкция окуляра в современных микроскопах, раз-

меется, несколько сложнее. Благодаря окуляру, который находится в верхней части микроскопа, человеческий глаз наблюдает объект. В состав окуляра входят несколько увеличительных линз, заключённых в оправу. Нижняя линза окуляра отвечает за фокусировку объекта исследования, а верхняя линза обеспечивает процесс наблюдения. Окуляры обладают сравнительно малой степенью увеличения, которая указана на оправе окуляра (7х;10х). Важным параметром в выборе окуляра микроскопа является вынос зрачка, расстояние между глазом и отверстием окуляра. Если специалист будет работать с микроскопом в очках, то стоит выбрать микроскоп с большим выносом, равным 10-20 мм;

- **объектив** – практически самая важная часть микроскопа, так как именно объектив обеспечивает основное увеличение, указанное на оправе объективов – 4, 10, 40, 100. Благодаря объективу строится микроскопическое изображение изучаемого предмета с точной передачей мельчайших деталей, цвета, структуры. Другими словами, пользователь сможет рассмотреть лежащий перед ним объект в деталях, даже если он не виден человеческим глазом между предметным столиком и источником света. Конденсор представляет собой линзу или систему линз, которая собирает и направляет на предмет световые лучи. Неотъемлемой деталью конденсора является апертурная ирисовая диафрагма;

- **диафрагма** – регулирует силу светового потока, поступающего на исследуемый объект. Объект исследования получается увеличенным именно благодаря совместному воздействию таких структур микроскопа как: окуляр, объектив и зеркало. Технические аспекты обеспечивают все остальные составляющие микроскопа.

Для того чтобы узнать, какое увеличение даёт микроскоп, нужно число на окуляре умножить на число на объективе.

К механической части относится:

- **тубус** – представляет собой трубку, в которой заключается окуляр. Тубус должен быть прочным и не деформироваться, так как иначе пострадают оптические свойства микроскопа;

- **основание** – обеспечивает устойчивость микроскопа во время работы. Именно на него крепится тубус, держатель конденсора, ручки фокусировки и другие детали микроскопа;

- **револьверная головка** – применяется для быстрой смены объективов;

- **предметный столик** – это то место, на котором размещается микропрепарат с исследуемым объектом;
- **макрометрический винт** – служит для предварительной ориентировочной установки изображения исследуемого объекта;
- **микрометрический винт** – используют для четкой установки объекта в фокусе.



Рис. 15 Строение микроскопа
(intergen.ru)

Люминесцентные микроскопы как правило, состоят из трех основных частей:

- 1) мощный источник света – представлен ртутно-кварцевой лампой сверхвысокого давления;
- 2) осветительное устройство – главная составная часть его – система светофильтров, позволяющая выделить из источника света нужные части спектра для возбуждения люминесценции (ультрафиолетовые, синие, фиолетовые лучи);
- 3) микроскоп – представлен теми же составными частями, что и обычный биологический микроскоп.

При люминесцентной микроскопии исследуемые объекты (микроорганизмы) видны, потому, что они становятся светящимися.

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

- опустить предметный столик микроскопа, поворачивая *макрметрический винт* на себя;
- освободить препарат от держателей-клемм препаратоводителя;
- после работы с иммерсией остатки её на фронтальных линзах объектива и конденсора удалить бумажной салфеткой или фланелевой тряпочкой, а затем тампоном, слегка смоченным ортоксилолом (C_8H_{10} «ЧДА») или петролейным эфиром (**масло Шервуда «Ч»**) или другим средством для чистки оптики (оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксации пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа);
- накрыть микроскоп чехлом.

ВАЖНО!!! После завершения работы в лаборатории части микроскопа протереть тампоном, смоченным 70% этиловым спиртом или иным эффективным дезинфицирующим средством, в следующей последовательности:

- основание,
- рукоятки макрметрического и микрометрического винтов фокусирования,
- предметный столик микроскопа.

Тампон и салфетку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором.

Алгоритм работы с люминесцентным микроскопом

Размещение объекта, фокусировка на объект и настройка визуальной насадки при работе в свете люминесценции производятся так же, как и в проходящем свете.

Для успешной работы в свете люминесценции необходимо соблюдать ряд требований:

- исследования проводить в максимально затемнённом помещении (при выключенном верхнем свете и закрытых тёмных шторах на окнах), тем самым можно избежать гашения люминесценции исследуемых объектов;
- микроскопию проводить сразу после окрашивания люминес-

центными красителями и высыхания препарата. В случае невозможности выполнить это требование, приготовленный препарат поместить в непрозрачный контейнер или завернуть в тёмную бумагу и убрать в прохладное место. Невыполнение данного требования может привести к гашению люминесценции и ложному результату;

- препарат с исследуемым объектом помещать в ход оптических лучей через 10-12 минут после включения блока питания ртутной лампы, когда ртутная лампа вошла в режим стабильной работы (во избежание тушения люминесценции).

Чтобы продлить срок службы ртутной лампы и блока питания необходимо помнить, что не следует часто включать и выключать блок питания. Выключить лампу можно не раньше, чем через 15 минут после включения. Повторное включение возможно только после остывания лампы (10-15 минут);

- правильно подобрать люминесцентные фильтры, подходящие для флюорохромных (люминесцентных) красителей, которыми окрашен препарат;

- в качестве иммерсионной жидкости использовать специальное масло для люминесценции;

- шторку светового барьера открыть только после фокусировки объекта. Иначе препарат выгорит, что приведёт к ложному результату.

Последовательность работы с мазком:

- закрыть шторку осветителя и опустить защитный экран на микроскопе. Включить блок поджига ртутной лампы в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Дать прогреться 10-12 минут;

- поместить на столик предметное стекло с мазком так, чтобы мазок находился прямо под объективом;

- закрепить препарат на столике с помощью клемм;

- выбрать участок препарата для начала просмотра с помощью ручек перемещения препаратопроводителя;

- открыть шторку осветителя, появится зелёный луч;

- начать медленно вращать винт грубой фокусировки (макрометрический винт) от себя, под зрительным контролем сбоку, до появления яркого светового всплеска (соприкосновение объектива с иммерсионным маслом на препарате);

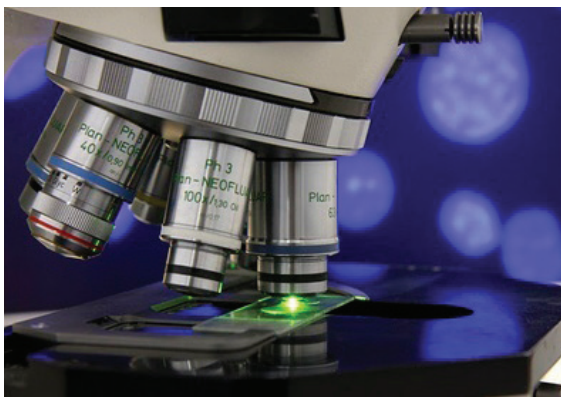


Рис. 17 Люминесцентный микроскопом
(<https://www.ziarulnational.md>)

- под зрительным контролем продолжать медленно поднимать столик вращением макрометрического винта от себя до появления зелёного цвета в поле зрения;

- чёткого изображения препарата добиться при помощи осторожного вращения микрометрического винта.

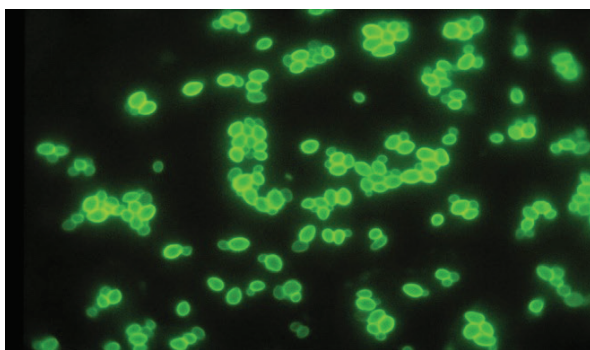


Рис. 18 Морфология в мазке *F.tularensis*
(<https://www.pinterest.com>)

По окончании микроскопического исследования необходимо выполнить следующие процедуры:

- опустить предметный столик микроскопа;
- убрать предметное стекло с мазком;

- с помощью специальной салфетки или фланелевой ткани протереть фронтальную линзу рабочих объективов микроскопа средством для чистки оптики;

- выключить блок поджига ртутной лампы;

- через 10-15 минут (после того, как ртутная лампа остынет!) закрыть микроскоп полиэтиленовым или пластиковым пакетом.

Уход за микроскопом

При работе с микроскопом нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал светофильтра.

Чтобы предохранить внутренние поверхности объективов, а также призмы тубуса от попадания пыли, необходимо всегда окуляр оставлять в тубусе. При чистке внешних поверхностей линз нужно удалять с них пыль мягкой кисточкой, промытой в эфире.

С зеркал, имеющих наружное серебрение, можно только удалять пыль, сдувая её резиновой грушей. Протирать их нельзя. Также нельзя самостоятельно развинчивать и разбирать объективы – это приведёт к их порче.

Для сохранения внешнего вида микроскопа необходимо периодически протирать его мягкой тряпкой, слегка пропитанной бескислотным вазелином, а затем сухой мягкой чистой тряпкой.

Переносить микроскоп нужно, придерживая за основание и за тубус.

Ошибки при работе с микроскопом и их последствия

	Ошибки	Последствия
1.	Нанесение большой капли иммерсионного масла на препарат	покроет стекло ненужным слоем
2.	Нанесение маленькой капли иммерсионного масла	не позволит получить четкое изображение
3.	Быстрое вращение макровинта без зрительного контроля сбоку	объектив может раздавить стекло препарата или изображение препарата будет пропущено
4	Применение излишней силы при фокусировке	смещение образца и искажение изображения

	Ошибки	Последствия
5.	Использование нестандартных покровных стекол, толщина которых более 0,17 мм	повредит фронтальные линзы, а иммерсионный объект при использовании сильных сухих систем (40x) не позволит получить изображение высокого качества
6	Применение суррогатов иммерсионного масла с оптическими характеристиками, отличающимися от стандартных	ухудшит качество изображения, агрессивные вещества, возможно входящие в их состав, повредят линзы и могут растворить клей, который их склеивает

Помните, что оптика микроскопа – это сложная чувствительная система, требующая бережного отношения с регулярным уходом. При правильной эксплуатации и соблюдении базовых требований по обслуживанию, она прослужит вам долго, предоставляя точные наблюдения.

Методы микроскопии

Светлопольная микроскопия (метод светлого поля) представляет собой метод исследования окрашенных клеток и тканей, в котором для освещения объекта применяют лучи видимого спектра. Изображение создаётся за счёт различий в степени поглощения света разными участками исследуемого объекта.

При прохождении луча через окрашенный объект происходит изменение интенсивности света, то есть изменяется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения хорошо улавливаются глазом человека.

Метод светлого поля осуществляется с помощью обычного светового микроскопа. Особенность этого метода состоит в применении иммерсионной жидкости (синтетическое иммерсионное масло), которая наносится на исследуемый препарат.

Поскольку светлое поле является наиболее широко используемым типом микроскопии, другие типы микроскопов могут быть адаптированы для светлого поля.



Рис. 19 Светлопольная микроскопия
(<https://dzen.ru>)

Темнопольная микроскопия (метод темного поля) позволяет изучать неокрашенные микроорганизмы. Освещение объекта происходит с боку, поэтому исследователем воспринимаются отраженные лучи.

При темнопольной микроскопии можно обнаружить частицы, которые при светлопольной микроскопии не видны. В основе темнопольной микроскопии лежит эффект Тиндаля – рассеивание света при прохождении светового пучка через оптически неоднородную среду. Для достижения эффекта Тиндаля используют специальный темнопольный конденсор, который устанавливают на место обычного конденсора. В темнопольном конденсоре внутренняя боковая поверхность зеркальная. Эффект Тиндаля достигается также использованием темнопольного фильтра, представляющего собой кружок черной бумаги, помещенной между линзами конденсора в центральной части так, чтобы только незначительная периферическая часть линзы оставалась свободной. При темнопольной микроскопии в объектив попадает незначительная часть лучей, прошедших через темнопольный фильтр и отражённых объектов.

Препарат для темнопольной микроскопии готовят методом “раздавленная” или “висячая” капля. Неосвещённое поле зрения остаётся тёмным, а бактерии выглядят ярко светящимися. При темнопольной микроскопии можно увидеть только контуры объекта, но невозможно изучить их внутреннюю структуру.

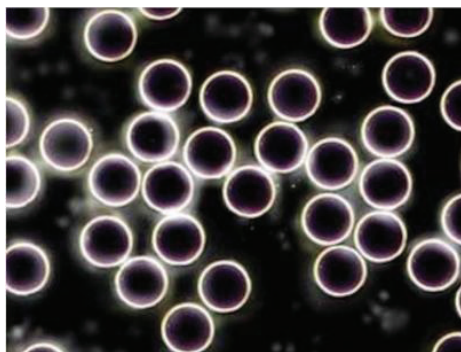


Рис. 20 Темнопольная микроскопия
(<https://darminaopel.ru>)

Фазово-контрастная микроскопия (метод фазового контраста) представляет собой метод микроскопического исследования малоконтрастных неокрашенных объектов, невидимых при обычной световой микроскопии (например, неокрашенных живых бактерий). При фазово-контрастной микроскопии контрастность изображения достигается сдвигом фаз световой волны. Дело в том, что световые волны, проходя через непрозрачные объекты (фиксированные и окрашенные препараты микробов, срезы тканей), меняют величину амплитуды (интенсивность света). Эти изменения улавливаются человеческим глазом.

Живые клетки микроорганизмов прозрачны и слабо поглощают свет, поэтому они изменяют только фазу проходящих лучей (скорость). Такие фазовые изменения глаз человека не улавливает, поэтому объекты выглядят малоконтрастными. Эти изменения становятся видимыми при использовании фазово-контрастной микроскопии, при которой фазовые изменения преобразуются в амплитудные. Таким образом, фазово-контрастная микроскопия позволяет преобразовать малоконтрастное изображение различающихся по плотности структур в контрастное и отчетливое изображение.

Для фазово-контрастной микроскопии используют специальное устройство, состоящее из фазового конденсора, фазовых объективов, вспомогательного микроскопа и светофильтров.

Одно из главных преимуществ метода в том, что живые клетки можно рассмотреть в их естественном виде. Данный метод позволяет

наблюдать и регистрировать динамику протекающих биологических процессов в высоком контрасте и с высокой четкостью мельчайших деталей образца.



Рис. 21 Фазово-контрастная микроскопия
(<https://present5.com>)

Конфокальная микроскопия. Достоинство этого метода состоит не в увеличении разрешающей способности, а существенном увеличении контрастности изображения. Этот метод дает две неопределимые возможности: позволяет исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности, а также оценивать результаты исследований в четырех измерениях (высота, ширина, глубина и время). В методе используются принципы иммуноцитохимии с применением специальных люминесцентных красителей для конфокальных микроскопов.

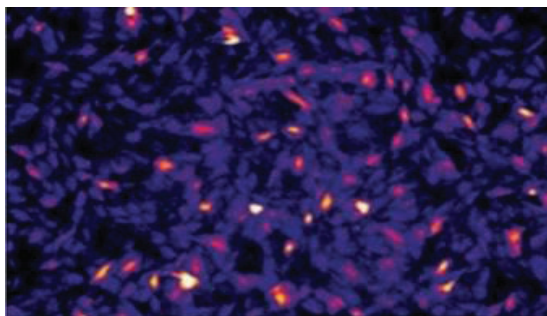


Рис. 22 Конфокальная микроскопия
(<https://shoes-web.ru>)

Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия занимает особое место среди методов диагностики бактериальных и вирусных инфекций. Флюоресценция является частным случаем люминесценции, поэтому оба термина часто взаимозаменяемы. Повышенная чувствительность, цветное изображение на тёмном нефлюоресцирующем фоне, возможность обнаружения микроорганизмов, простота и надёжность флюорохромирования – ценные качества этого вида микроскопии.

Люминесцентная микроскопия в практической микробиологии используется для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний с помощью реакции иммунофлюоресценции. Особое значение люминесцентная микроскопия имеет при экспресс-диагностике инфекционных болезней, при экспресс-индикации возбудителя во внешней среде. Результаты люминесцентной микроскопии являются довольно специфичными и высокоточными. Результат этого вида микроскопии зависит от качества и специфичности флюоресцирующих сывороток и специальных красок – флюорохромов. Люминесцентная микроскопия находит все более широкое применение. Результаты исследования люминесцентным методом готовы в течение 2-4 часов.

Люминесцентная микроскопия основана на способности многих веществ биологического происхождения и красителей светиться под воздействием падающего на них света. Молекулы веществ, способных к люминесценции, поглощают энергию падающего на них света и переходят в возбужденное состояние, которое характеризуется более высоким энергетическим уровнем. В таком состоянии они находятся непродолжительное время и вновь возвращаются к исходному энергетическому уровню. Этот период сопровождается отдачей избытка энергии в виде света – люминесценцией. Как правило, для возбуждения люминесценции объект освещают ультрафиолетовыми лучами длиной волны 300-400 нм или сине-фиолетовыми лучами длиной волны 400-460 нм.

Ряд веществ биологического происхождения – хлорофилл, витамин B₂, алкалоиды, некоторые антибиотики и другие соединения обладают собственной (первичной) люминесценцией. В зависимости от содержания таких веществ в клетке, некоторым дрожжам и бактериям также свойственна первичная люминесценция.

Однако клетки большинства микроорганизмов люминесцируют очень

слабо, поэтому их обрабатывают специальными красителями – флюорохромами. Такая наведенная люминесценция называется вторичной.

Для получения эффекта вторичной люминесценции используют:

- метод простого флюорохромирования (МФ);
- методы флюоресцирующих антител (МФА, иммунофлюоресценция).

Метод флюорохромирования по технике выполнения не отличается от методов обычной окраски мазков, применяемых при световой бактериоскопии. Для этой цели используют краски, которые светятся в момент облучения их ультрафиолетовыми лучами. Такие краски называются флюорохромами, а окрашивание ими – метод флюорохромирования. Флюорохромы растворяют в дистиллированной воде (1:500-1:100000). Такие растворы малотоксичны.

Метод простого флюорохромирования несложен, однако в большинстве случаев он не дает возможности полностью дифференцировать возбудителей болезней.

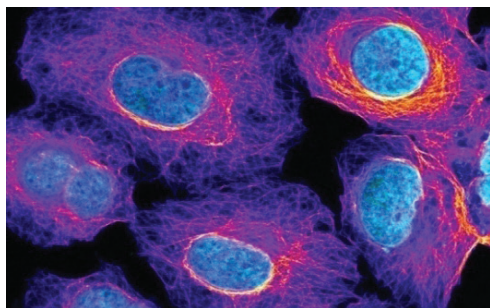


Рис. 23 Метод флюорохромирования
(<https://bioptic.ru>)

Методы флюоресцирующих антител (МФА) основаны на принципе специфического взаимодействия антигена со специфическими антителами, но антитела здесь применяются меченые, т.е. предварительно окрашенные флюорохромом. Эти методы являются по своей сущности разновидностью серологических реакций, но ставятся они на предметном стекле (в мазке).

В настоящее время налажено производство флюоресцирующих сывороток и гаммаглобулинов централизованным путем. Выпускаются они в сухом виде в ампулах с приложением на каждую упаковку инструкции по применению и с указанием титра сывороток.

МФА можно разделить на две разновидности:

1) прямой метод – к исследуемой взвеси микробов, фиксированной на стекле, добавляют сыворотку, меченную флюорохромом. Образующий комплекс Ag+At при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами даёт ярко-зелёное свечение. Данный метод является экспрессным и высокочувствительным. К недостаткам прямого метода следует отнести то, что при этом в лаборатории нужно иметь на каждый возбудитель специфическую флюоресцирующую сыворотку (или глобулин), которые имеют небольшой срок хранения;

2) непрямые методы:

а) с использованием антивидовой флюоресцирующей сыворотки;

б) с использованием антикомплементарной флюоресцирующей сыворотки. Непрямой метод отличается от прямого тем, что он является двухэтапным. При непрямом МФА используют обычные диагностические сыворотки против какого-либо вида микробов. Добавление этой сыворотки к испытуемой взвеси микробов вызывает образование комплекса Ag+At. Этот комплекс выявляется с помощью универсальной флюоресцирующей сыворотки, содержащей антитела к гаммаглобулиновой фракции крови того вида животного, от которого была получена диагностическая сыворотка, либо с помощью флюоресцирующего антикомплементарного глобулина.

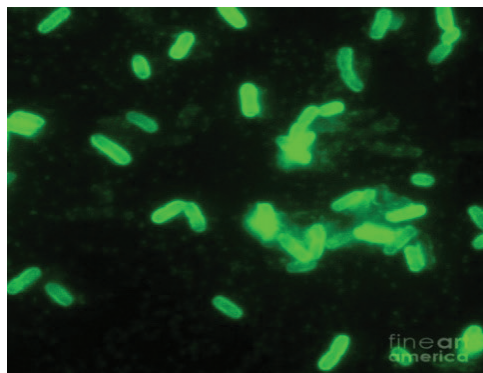


Рис. 24 Метод иммунофлюоресценции
(<https://www.pinterest.com>)

Двойная иммунофлюоресценция

Одна из наиболее важных особенностей МФА состоит в возмож-

ности одновременной идентификации двух разных антигенов даже при их локализации в одной и той же области. В наиболее простом варианте для этого служит прямая иммунофлюоресценция с двумя различными по специфичности флюорохромами, один из которых содержит флюоресцеин, другой – родамин.

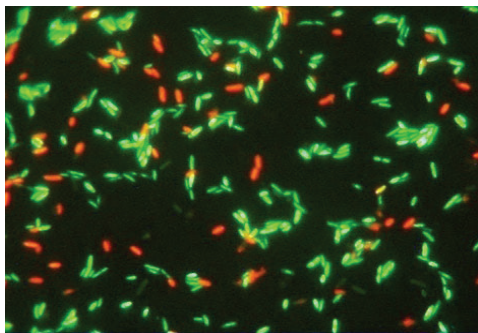


Рис. 25 Двойная иммунофлюоресценция
(<https://бмэ.орг/index.php>)

Для люминесцентного микрофотографирования используют специальное нефлуоресцирующее масло (в случае его отсутствия – диметилфталат или трис-глицериновую смесь)

Электронная микроскопия используется для изучения структуры клеток на субклеточном и молекулярном уровнях, что позволяет более глубоко понять молекулярные и клеточные процессы в организмах, а также детально изучить структуру вирусов, бактерий и других микроорганизмов. Ценность электронной микроскопии в том, что можно получать очень большое увеличение (вплоть до 300 000) с сохранением высокого разрешения, вплоть до атомов. Такой результат достигается при прямом наблюдении объекта. То есть не требуется дополнительных увеличений и заключается в её способности разрешать объекты, не разрешаемые оптическим микроскопом в видимом или ультрафиолетовом свете. Электронно-микроскопическому исследованию могут быть подвергнуты как ультратонкие срезы различных тканей, клеток, микроорганизмов, так и целые бактериальные клетки, вирусы, фаги, а также субклеточные структуры, выделяемые при разрушении клеток различными способами.

Электронная микроскопия требует специальной подготовки объ-

ектов исследования, в частности: фиксации тканей или микроорганизмов, обезвоживания (так как вода сильно рассеивает электроны), заливки в твердые среды (эпоксидные смолы), приготовления ультратонких срезов, толщина которых не должна превышать 40-60 нм. С целью повышения четкости наблюдаемой картины используют методы позитивного или негативного контрастирования, а также метод оттенения (нанесении тонкого слоя металла на объект, который находится в вакууме).

При сканирующей микроскопии образец фиксируют, высушивают на холоде и напыляют в вакууме золотом или другими тяжелыми металлами. Таким образом получают реплику (отпечаток), повторяющую контуры образца и впоследствии сканируемую.

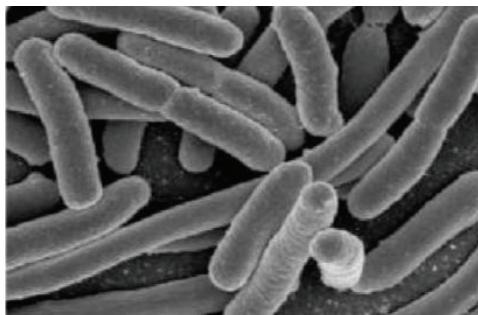


Рис. 26 Сканирующая микроскопия
(<https://medcollege5.ru>)

Атомно-силовая микроскопия метод изучения строения и свойств поверхности твёрдых тел с субнанометровым пространственным разрешением. Является одним из наиболее мощных методов получения изображения нанорельефа и его дальнейшего исследования. Уникальность метода заключается в высокой разрешающей способности, неразрушающем характере анализа, возможности работы не только в условиях вакуума, но и в среде, получении трехмерного изображения рельефа.

Атомно-силовая микроскопия используется для технологического контроля изделий микроэлектроники, магнитных носителей информации, в материаловедении и научных исследованиях, а также при решении задач микробиологии, молекулярной биологии и медицины.



Рис. 27 Бактерия из рода Pseudomonas
(<https://www.ntmdt-si.ru>)

Морфология бактерий. Основные формы бактерий

Морфология бактерий (греч. bacteria– палочка) – один из таксономических признаков бактерий, учитываемый при их идентификации.

Идентификация бактерий – установление систематического положения выделенного микроорганизма до уровня вида (варианта). При установлении видовой принадлежности оценивают форму и взаимное расположение клеток, размер, особенности строения клеточной стенки и поверхностных структур (наличие жгутиков, капсулы), способность к спорообразованию, окраску.

Установление видовой принадлежности микроорганизма – наиболее важный аспект микробиологической диагностики инфекционных заболеваний.

Основным справочным пособием для идентификации бактерий является «Определитель бактерий Берджи».

Основные формы бактерий:

1. Шаровидные или сферические (**кокки**). Большинство кокков имеют шаровидную или овальную форму, клетки некоторых видов могут быть эллипсоидными, бобовидными или ланцетовидными, их размер 0,5-1,0 мкм. Они могут существовать как одиночные клетки (микрочкокки) или объединяться в группы (диплококки, гонококки, менингококки, стрептококки, тетракокки, сарцины, стафилококки).

Эта форма считается одной из древнейших, и предполагается, что кокковидные формы произошли от бактерий, имевших форму палочек, в процессе эволюции.

2. Палочковидные (бациллы). Длина клеток варьирует от 1,0 до 10 мкм, толщина от 0,5 до 2,0 мкм. По толщине они могут быть тонкими или толстыми. Подобно коккам, бациллы могут существовать как одиночные клетки или объединяться в группы. Палочковидные формы, не способные образовывать споры, называются бактериями, спорообразующие формы – бациллами. Эта форма считается одной из самых ранних форм бактерий, и считается, что она менее выгодна с точки зрения адаптивности по сравнению с другими формами.

3. Извитые, спиралевидные (вибрионы, спириллы, спирохеты). Извитые бактерии подразделяют на две основные группы: вибрионы и спирохеты. Их форма обеспечивает им гибкость и может быть связана с их способностью к передвижению и адаптации к различным условиям.

Кроме этих форм обнаруживаются ветвящиеся, нитевидные, треугольные и звездообразные бактерии. Бактериальные клетки могут располагаться не только одиночно, но и образовывать скопления.

Техника безопасности при работе с диагностическим материалом

Микроскопия окрашенных или нативных мазков играет важную роль в бактериологических, вирусологических, цитологических и других исследованиях, поскольку она даёт объёмную информацию об изучаемом объекте. Одним из ответственных этапов в данной работе является приготовление мазков. Любые исследуемые образцы биологического материала следует рассматривать как потенциально заразный материал. При работе с ПБА I и II группы патогенности (опасности) следует помнить, что успех в исследовании определяется не только качеством приготовленных мазков, но и соблюдением биологической безопасности при их приготовлении (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»). Вся работа с инфицированным или с подозрением на зараженность материалом, проводится в боксах микробиологической безопасности (БМБ) класс II тип А2 или класс II тип В2, которые обеспечивают безопасную и надёжную работу с ПБА.

Для защиты персонала, работающего с инфицированным материалом, используются средства индивидуальной защиты (СИЗ).

При приготовлении мазков, следует помнить, что аэрозоли могут образовываться в процессе следующих манипуляций:

- при открывании ёмкостей с материалом (пробирки, флаконы, чашки Петри и т. д., контейнеры с патологоанатомическим материалом и др.);
- при приготовлении мазков путём нанесения материала на предметное стекло и распределении его по поверхности стекла;
- при прожигании бактериологической петли в процессе работы.

Встречается фиксировать мазки над пламенем горелки, поскольку это приводит к разбрызгиванию частичек материала (после высыхания на воздухе мазок фиксируется и обеззараживается: этиловым спиртом, этиловым спиртом с 3% перекисью водорода, смесью Никифорова и др.).

По окончании работы рабочая поверхность БМБ, инструменты, СИЗ обрабатываются дезинфицирующим раствором. Затем БМБ обеззараживается УФ излучением.

Методы приготовления и окрашивания микроскопических препаратов

Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования – совокупность способов изучения морфологических и тинкториальных (способность окрашиваться) свойств микробов в исследуемом материале (культура, патологический материал, пробы из внешней среды) с помощью микроскопии. Основная цель – установление этиологии болезни, морфологическая идентификация, а также определение чистоты выделенной культуры.

Клеточная стенка бактерий является их важным отличительным признаком. В целях более подробного изучения клеточных структур бактерий микробиологические препараты окрашивают.

Методы, используемые для изучения нативных препаратов

Нативные препараты – это нефиксированные и не окрашенные препараты. Путем микроскопии в препарате выявляют живые микроорганизмы, оценивают подвижность и морфологические свойства возбуди-

теля. Наибольшее распространение получили метод «раздавленной» и «висячей» капли. При микроскопии живых микроорганизмов, следует предпринимать определенные меры предосторожности.

Метод «раздавленной» капли. На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают её покровным стеклом. Капля должна быть небольшой, не выходящей за край покровного стекла. Метод используют в **реакции иммобилизации вибрионов (РИВ)**.

Приготовление препарата:

1. На сухое обезжиренное предметное стекло наносят маленькую каплю (капля должна быть настолько мала, чтобы после прижатия ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него) воды, физиологического раствора (0,9% раствор NaCl) или бульона.

2. В каплю осторожно вносят петлей небольшое количество клеток изучаемой культуры, отобранной с плотной среды и суспендируют (при работе с жидкой культурой каплю воды на предметное стекло не наносят).

3. Покровное стекло берут пинцетом, ставят на ребро у капли и медленно опускают, стараясь, чтобы между стёклами не образовались пузырьки воздуха, и капля находилась по середине покровного стекла.

4. Пинцетом осторожно прижимают покровное стекло к предметному и следят, чтобы материал не выходил за пределы покровного стекла.

5. Приготовленный препарат сразу же микроскопируют: окуляр 10х, объектив 40х.

После микроскопии препарат «раздавленной» капли опускают в дезинфицирующий раствор.

Недостаток метода в том, что препараты быстро высыхают, поэтому следует просматривать их сразу после изготовления или помещать во влажную камеру.



Рис. 28 Метод «раздавленной» капли
(<https://clck.yandex.ru>)

Метод «висячей» капли. Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной культуры. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь её дна или края. Для микроскопии вначале используют сухой объектив на 8х, под увеличением которого находят край капли, а затем устанавливают объектив на 40х и исследуют препарат.

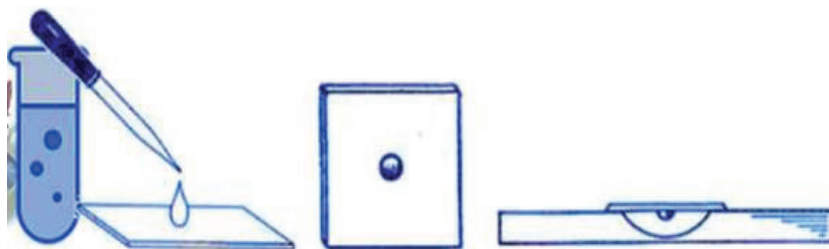


Рис. 29 Метод «висячей» капли
(<https://znanio.ru>)

Прижизненная (витальная) окраска. Взвесь микроорганизмов вносят в каплю 0,001% раствора метиленового синего или нейтрального красного. Затем готовят препарат «висячая» или «раздавленная» капля и микроскопируют. После микроскопии препараты «висячей» или «раздавленной» капли опускают в дезинфицирующий раствор.

Методы изучения окрашенных препаратов

Можно окрашивать живые бактериальные формы, однако такая окраска не даёт полной картины строения микробной клетки. В связи с этим микроорганизмы в препарате фиксируют. Фиксация убивает живые клетки и одновременно закрепляет их на поверхности предметного стекла.

Изучение морфологии микробов в окрашенном состоянии является наиболее распространённым в микробиологии методом. Этот метод имеет много достоинств:

- 1) он позволяет изучить морфологические особенности микробов

и даёт возможность найти различия между ними, иногда даже точно определить изучаемый микроорганизм;

2) он удобен в практической работе, так как значительно легче проводить исследование, пользуясь убитыми микробами, чем живыми (особенно при изучении патогенных микробов);

3) он весьма доступен благодаря сравнительной простоте техники окрашивания.

Последовательность работы с целью получения окрашенного препарата:

1. Делают надпись простым карандашом на матовой поверхности отшлифованного края предметного стекла. На обратной стороне стекла карандашом по стеклу чертят границы мазка.

2. Наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия на чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло (стекло считается обезжиренным, если нанесённая капля воды равномерно растекается по поверхности, а не принимает шаровидную форму или распадается на отдельные капельки), в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром около 1,0-1,5 см, только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то его петлей непосредственно наносят на предметное стекло и готовят мазок.

Мазок-отпечаток готовят кусочком органа. Для этого срезом вырезанного кусочка прикасаются к предметному стеклу один или несколько раз.

3. Высушивают мазок при комнатной температуре на воздухе или в термостате. Нельзя подогреть, т. к. при интенсивной потере влаги происходит быстрое свертывание белков и клетка теряет естественную форму. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает равномерно и быстро.

4. Мазки фиксируют после полного их высыхания с целью закрепления на стекле. Убитые микробы лучше воспринимают окраску.

В качестве фиксирующей жидкости при исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность бактериальными возбудителями I–II групп патогенности, используют метиловый или этиловый спирты, смесь Никифорова (равные объёмы этилового спирта и эфира), ацетон, пары формалина.

Для фиксации мазков чаще используют 95% этиловый спирт, который имеет ряд преимуществ:

- быстро проникает в ткани;
- быстро и необратимо денатурирует белки, незначительно нарушая их строение;
- хорошо уплотняет материал, который затем хорошо прокрашивается большинством красителей;
- химически нейтрален и относительно индифферентен, так как не оказывает заметного воздействия на реакционноспособные группы и поэтому употребляется при изучении физико-химического состояния клеток.

Мазки из культуры микроорганизмов фиксируют не менее 30 мин; из материала, содержащего белковое вещество (мокрота, гной и др.), – не менее 40 мин; мазки-отпечатки органов – не менее 1 часа. Мазки из споровой культуры, материала, подозрительного на зараженность спорообразующими бактериями (например, возбудителем сибирской язвы), материала от больных с неясной этиологией необходимо фиксировать в 95% этиловом спирте, содержащем 3 % H_2O_2 .

Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор. Фиксация мазков над пламенем категорически запрещена!

5. Наносят краску на мазок. Окрашивание микробов не является механическим процессом проникновения краски в микробную клетку. Механизм окраски микробов следует рассматривать как процесс физико-химический, как адсорбцию краски микробной клеткой. Соединение микроба с краской является в большинстве случаев весьма стойким, не поддаётся разрушению или простому вымыванию водой; нередко разные виды микробов по-разному реагируют с одними и теми же красками, что свидетельствует о разнице химического состава их протоплазмы. В ряде случаев различные составные части микробной клетки избирательно окрашиваются различными красящими растворами.

Окрашенные препараты имеют следующие преимущества:

- они менее опасны, так как все манипуляции проводятся с фиксированным материалом;
- в них легко различимы отдельные детали структуры микробной клетки, не выявляющиеся в неокрашенном препарате;
- могут храниться длительное время и, следовательно, использоваться для учебных целей как демонстрационный материал.

К недостаткам окрашенных препаратов следует отнести:

- невозможность изучения физиологии микробов (подвижность,

характер деления, прорастание спор и т. д.);

- деформацию микробных клеток после фиксации и воздействия красящих растворов.

Оборудование рабочего места для окраски мазков

Окраску мазков производят на специально оборудованном столе. Стол должен быть покрыт материалом, устойчивым к действию моющих и дезинфицирующих средств. Для этого подходит химически устойчивый негигроскопичный пластик, ламинированная или керамическая плита, линолеум, стекло и т. п.

На столе должно быть всё необходимое для окраски мазка:

- сосуд с дистиллированной водой,
- ёмкость для слива красок,
- подставка из двух стеклянных трубочек или палочек, соединённых с обеих сторон резиновыми трубками или ёмкости для окрашивания стекол,

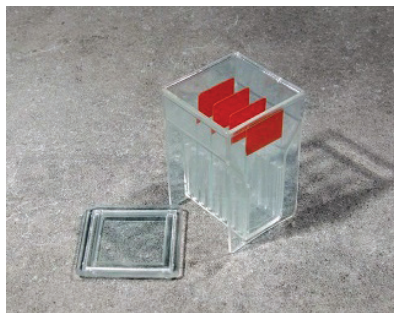


Рис. 30 Ёмкость или штатив для окраски препаратов (типа Хеллендаля) на 8 стекол

<https://www.agat.ru>

- пинцеты, цилиндры разных размеров, градуированные и глазные пипетки,
- фильтровальная бумага,
- набор красок, часто употребляемых в работе.

Желательно, чтобы стол для окрашивания мазков находился рядом с водопроводным краном.

Подготовка предметных и покровных стёкол

Предметное и покровное стёкла являются частью оптической системы микроскопа. Оптические параметры и толщина предметного стекла входят в расчёт конденсора, а параметры и толщина покровного стекла – в расчёт объектива. Следует помнить, что применение нестандартных стёкол ухудшает качество изображения. Особенно важно соблюдать расчётные значения при ответственных экспериментах. Требования к предметным и покровным стёклам тем выше, чем больше числовая апертура. Кроме того, в зависимости от метода исследования, к ним могут предъявляться дополнительные требования.

Предметные и покровные стёкла для микроскопических исследований должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Новые стёкла, не бывшие в употреблении, моют в тёплой мыльной воде, ополаскивают проточной водой, заливают смесью Никифорова на 2-3 дня. Если стёкла сохраняют следы жира, то заливают 2-5% раствором гидрокарбоната натрия (сода) или едкого натра (мыло), затем ополаскивают проточной и дистиллированной водой. Хранятся чистые стекла в широкогорлых банках с притертыми крышками в сухом виде, либо в смеси Никифорова или в спирте. Чистые стекла можно брать только прокалённым пинцетом. Если, не смотря на обработку, стекло плохо обезжирено, то можно натереть его сухим кусочком мыла, а потом протереть чистой марлей. Перед приготовлением препарата стекло прожигают в пламени спиртовки.

При возможности лучше использовать коммерческие шлифованные обезжиренные предметные стёкла, на пример: D100002 Стёкла предметные НС 76x26x1.

Причины ошибок при микроскопических исследованиях

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены следующими причинами:

- плохая обработка многоцветных флаконов для сбора материала, предметных стёкол, в которых могут оставаться бактерии;
- использование для приготовления мазка некачественно обработанных бактериологических петель, пипеток или деревянных палочек;
- применение предметных стёкол с царапинами и другими дефектами, в результате чего появляются артефакты, которые ошибочно

могут быть приняты за бактерии; красная краска может иногда задерживаться на царапинах и создавать у начинающего исследователя ошибочное представление. Такие царапины нередко образуют параллельные ряды. Обычно они более грубые и больше по размерам. Их несложно идентифицировать, так как они находятся на стекле в более глубокой плоскости (под мазком) и исчезают, если установить фокус на клетки;

- недостаточное обесцвечивание мазка, что может привести к сохранению красной окраски на некоторых бактериях;

- возможно наличие волокон шерсти, хлопка, фильтровальной бумаги, но они обычно встречаются единично и чаще всего в одном поле зрения.

Ложноотрицательные результаты могут быть обусловлены следующими причинами:

- плохим качеством или недостаточным количеством исследуемого материала;

- приготовлением слишком тонкого или толстого мазка, или несоблюдением режимов окрашивания (неправильная экспозиция при окраске);

- нарушением методики просмотра мазка (малое число просмотренных полей зрения);

- плохим качеством красителей и реагентов.

Мазки, окрашенные флюорохромами, при длительном хранении могут утрачивать флюоресценцию.

Красители для бактериоскопии

В микробиологии используют различные красители, подразделяемые по их способности окрашивать определенные структурные образования микробных клеток.

Обычно различают 4 большие группы красителей:

- 1. Основные (или ядерные) красители**, избирательно окрашивающие ядро, и базофильные (от лат.basis – основной) структуры бактериальных клеток.

- 2. Кислые (или цитоплазматические) красители**, которые окрашивают преимущественно цитоплазму, реже – клеточные стенки.

- 3. Нейтральные красители**, избирательно окрашивающие отдельные компоненты цитоплазмы. Нейтральные красители – это

смесь кислых и основных красителей, в которой катион и анион обладают красящими свойствами.

4. Флюорохромы – группы красителей, способных флюоресцировать при той или иной длине волны возбуждающего света. Несмотря на то, что флюорохромы выделены в самостоятельную группу, большинство из них следовало бы отнести к цитоплазматическим красителям, реже к ядерным.

Интенсивность окрашивающей способности красителя зависит от рН среды: основные красители окрашивают объект тем интенсивнее, чем больше щелочи в среде, кислые – в более кислой.

При бактериологическом исследовании для окраски микробов применяются основные анилиновые краски.

Наиболее часто употребляемые красители

Основные	Кислые	Нейтральные	Флюорохромы
<p><u>Красные:</u> фуксин основной, конго красный, сафранин, нейтральный красный, пиронин.</p> <p><u>Синие:</u> метиленовый синий, Виктория.</p> <p><u>Фиолетовые:</u> кристаллический фиолетовый, гематоксилин, ферциан фиолетовый, тионин.</p> <p><u>Зеленые:</u> малахитовый зеленый, метиленовый зеленый, бриллиантовый зеленый, Янус зеленый.</p> <p><u>Коричневые:</u> хризоидин, везувин</p> <p><u>Черные:</u> индулин.</p>	<p><u>Красные и розовые:</u> фуксин кислый, эозин, эритрозин, тропеолин.</p> <p><u>Желтые:</u> Лурантия, Конго красный, пикриновая кислота.</p> <p><u>Черные:</u> нигрозин (индийские чернила)</p>	<p>Судан III, нильский синий</p>	<p>акридин оранжевый, акридин желтый, аурамин, флюоресцеин, нейтральный красный, риванол и др.</p>

Красители для бактериоскопии продаются в виде аморфных или кристаллических порошков, из которых готовят красящие растворы. Исходным материалом для приготовления необходимых рабочих красок являются насыщенные спиртовые растворы указанных красителей. Спиртовые растворы готовят впрок и сохраняют в склянках с притёртыми пробками. Сами по себе спиртовые растворы для окраски микробов не применяются.

Все флаконы с реактивами и красителями заводского производства должны иметь отметку о дате получения и вскрытия заводской упаковки. Любые некачественные материалы следует специально помечать и удалять из лаборатории. На складе или в лаборатории следует иметь запас реактивов и расходных материалов на 6 месяцев работы, регулярно контролируя их сроки годности.

Способы окраски микроскопических препаратов

Различают *простое* и *сложное* окрашивание микроорганизмов.

Простая окраска позволяет обнаружить в микроскопируемом материале микробов, определить их количество, быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов. Простые методы окраски используются для ориентировочной, предварительной микроскопии: определения наличия бактерий в патологическом материале, определения их формы и расположения в мазке.

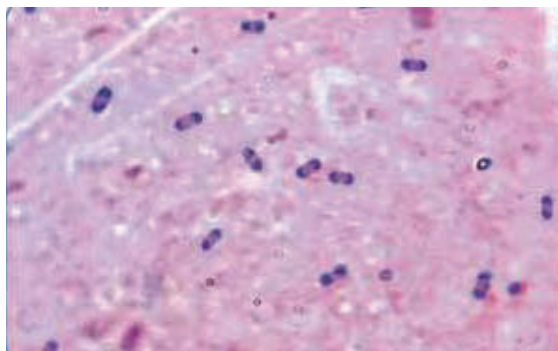


Рис. 31 *Y.pestis*. Мазок из пунктата лимфатического узла.

Окраска метиленовым синим

(<https://ppt-online.org>)

Для простой окраски используют только один краситель, чаще всего красного цвета – раствор фуксина (окраска 10-30 сек), фиолетового – генцианвиолет (окраска производится в течение 1-2 мин) или синего – метиленовый синий (окраска 3-5 мин). Следят за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и, в случае необходимости, добавляют новую порцию красителя.

Простой метод окрашивания может быть применён как для окрашивания убитых микробных клеток в фиксированных микропрепаратах, так и для прижизненной окраски микроорганизмов. Прижизненной окраской следует считать лишь такую, при которой окрашенные организмы длительное время остаются живыми и способными к размножению.

Прижизненное окрашивание позволяет наблюдать одновременно как особенности строения, так и особенности функционирования организмов, клеток и тканей.

Красители, пригодные для прижизненного окрашивания, называются **витальными**. Эти красители имеют низкую токсичность и обладают способностью легко проникать в живые клетки и их структуры через клеточные оболочки и цитоплазматические мембраны.

По оптическим свойствам различают витальные красители:

- для видимого света;
- флюоресцентные красители.

По химическим свойствам различают:

- основные – акридиновый оранжевый, метиленовый синий;
- кислотные (кислые) – индигокармин, кислый фуксин, калий-флюоресцин, эозин;
- электронейтральные – родамин В.

Среди простых методов окраски существуют как позитивные, так и негативные способы окрашивания. В этом случае микроорганизмы, в которые краситель не проникает, выглядят как светлые частички на равномерно окрашенном фоне.

К простым позитивным методам окраски относится окраска по методу Леффлера, который позволяет выявить многие детали формы и структуры микроорганизмов (прил. 2.5.(в); 4.10.), к негативным – окрашивание по методу Бури (прил. 2.10.; 4.3.).

Простой метод очень удобен для самых разнообразных целей: изучение формы и расположения клеток, определение размеров, обнаружение капсул у микробных клеток в мазках-отпечатках из органов инфициро-

ванного организма и пр. Однако простой метод окраски не позволяет дифференцировать микроорганизмы (в том числе и бактерии), сходные по форме и размерам, но принадлежащие к различным видам.

В силу этого большую ценность представляют сложные методы окраски, позволяющие получить представление не только о форме, размерах, расположении клеток друг относительно друга, но и позволяющие дифференцировать микробы и определять структурные детали микробных клеток.

Сложные методы предусматривают воздействие на один и тот же препарат двух красок. Данные методы окраски позволяют обнаруживать в теле микробной клетки различные структурные элементы (капсулы, споры, включения).

Среди сложных методов окраски большую ценность представляет способ окраски, разработанный датским ученым Грамом, позволяющий дифференцировать микроорганизмы на две большие группы, называемые «грамположительными» и «грамотрицательными», что имеет большое значение при идентификации микроорганизмов.

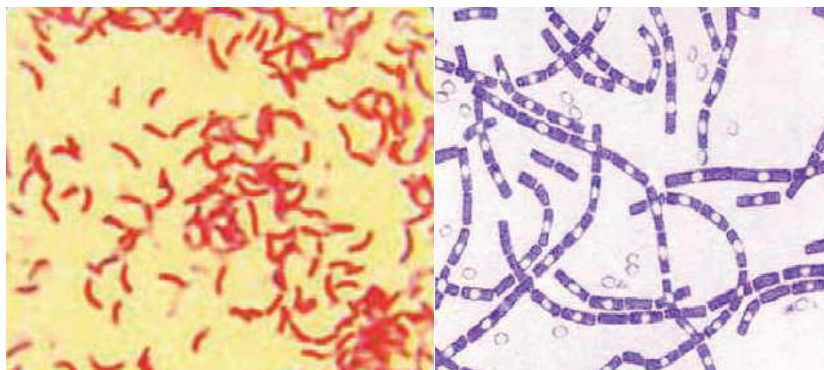


Рис. 32 *V.cholerae* *B.anthraxis*
(<https://piemuseum.ru>)(<https://www.neizvestniy-geniy.ru>)

Чистая культура. Окраска по Граму

Методы окраски

Методика окраски по Граму – особенностью окраски по Граму является неодинаковое отношение различных микробов к красителям.

Микробы, входящие в группу грамположительных, дают прочное соединение с красителями и йодом. Окрашенные микробы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином грамположительные микробы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Это объясняется строением клеточной стенки грамположительных бактерий. Основным компонентом толстой клеточной стенки этих бактерий является многослойный пептидогликан, с которым ковалентно связаны тейхоевые кислоты.

Грамотрицательные бактерии образуют с генциановым фиолетовым и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином в красный цвет. Клеточная стенка таких бактерий представлена тонким слоем пептидогликана.

Некоторые виды бактерии могут окрашиваться по Граму вариabельно, и это может зависеть от ряда факторов:

- от возраста культуры. У каждого бактериального вида есть определённый максимальный возраст, в котором наиболее чётко выражено характерное отношение данного вида к окраске по Граму. Молодые культуры грамположительных бактерий более устойчивы к обесцвечиванию, чем старые, в «старых» культурах тинкториальные свойства микроорганизмов могут быть смазаны. Есть мнение, что 48-часовые культуры более устойчивы, чем 24-часовые. Поэтому для окраски нужно брать всегда молодые 1- суточные культуры;

- особенностей культивирования. Например, даже место на поверхности скошенного агара может влиять на результаты окраски по Граму. Препарат, приготовленный из газона, снятого с верхнего, уже подсыхающего участка агара, может дать совершенно иные результаты, чем приготовленный из нижней, более влажной части агара;

- от многих других факторов.

Основная ошибка, допускаемая при окраске по Граму, состоит в «переобесцвечивании» мазка этиловым спиртом. Грамположительные бактерии при этом могут утрачивать первоначальную окраску генциановым фиолетовым и приобретать красный цвет (характерный для грамотрицательных бактерий) в результате последующей докраски мазка фуксином. Грамотрицательные бактерии, в свою очередь, могут сохранять сине-фиолетовый цвет генцианового фиолетового. Для правильной окраски следует строго соблюдать технику обесцвечивания.

Для получения достоверных результатов окраски мазок надо делать тонким. В густых мазках, приготовленных из грамотрицательных культур, клетки находятся в скоплениях («кучках») и на эти скопления выпадает осадок красителя, обесцвечивание которого происходит гораздо труднее. Наоборот, грамположительные организмы в местах скоплений обесцвечиваются значительно скорее, чем одиночно расположенные клетки. Бактерии в препарате должны находиться на возможно большем расстоянии одна от другой.

Со временем метод окраски по Граму стал основным методом, с которого начинается таксономическая идентификация выделенных от больного патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (прил. 4.1.)

Существует множество других модификаций окраски по Граму (с использованием тартразина и светлого зеленого, основного фуксина и др.). Чаще всего усовершенствования направлены на улучшение окраски грамотрицательных микроорганизмов и тех, которые плохо окрашиваются общепринятым методом.

Метод микроскопии по Цилю-Нильсену – это способ обнаружения и дифференциации кислотоустойчивых бактерий от некислотоустойчивых. При окраске по Цилю-Нильсену используют препарат фуксина Циля, с помощью которого осуществляется окраска бактерий.

Кислотоустойчивость обусловлена наличием в клеточной стенке бактерий повышенного количества липидов, воска и миколовой кислоты. Раствор карболовой кислоты разрыхляет клеточную стенку и тем самым повышает её тинкториальные свойства, а высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливает реакцию взаимодействия красителя с бактериальными клетками, которые окрашиваются в красный цвет.

Таким образом, при обработке препарата серной кислотой не-кислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые бактерии остаются окрашенными фуксином в красный цвет.

С помощью этого метода можно проанализировать мокроту пациента, спинномозговую жидкость, мочу и серозные жидкости полостей (прил. 4.11.)

Окраска по Козловскому – бруцеллы, по сравнению с посторонними микроорганизмами, наиболее часто встречающимися в обследуемых материалах, медленно воспринимают некоторые краски,

в частности растворы сафранина, на этом свойстве бруцелл и основан метод окраски по Козловскому. Метод с успехом применяют лаборатории при исследовании мазков, приготовленных из выделений матки, плаценты, сычуга и других органов абортированного плода, плодных оболочек, гноя и др. (прил.4.9.)

На капсулу - обнаружение капсул бактерий имеет значение как для их дифференциации, так и для определения их вирулентности.

Некоторые виды бактерий продуцируют слизистое вещество, которое, концентрируясь вокруг тела микробной клетки, образует капсулу. При обычных методах окраски капсулы остаются бесцветными. Это позволяет применять простые методы окраски для выявления капсульных микроорганизмов в мазках из органов и тканевой жидкости. При окраске метиленовым синим клетки тканей и тела бактерий окрашиваются в голубой цвет, вокруг бактерий сохраняется бесцветная зона – капсула, которая выявляется на темном фоне.

Для **выявления капсул** пользуются различными методами, среди которых можно отметить *методы Бурри, Бурри-Гинса, Романовского-Гимза, Михина и раствором Ребигера* (прил. 2.5.(в); 2.7.; 2.9.; 2.10.; 4.3.; 4.4.; 4.5.; 4.6.; 4.8.; 4.15.)

На споры - споры бактерии образуются при неблагоприятных условиях. Они созревают внутри бактериальной клетки и обычно имеют сферическую или овальную форму.

Спора окружена толстой оболочкой, которая предохраняет её содержимое от высыхания. Оболочка устойчива к действию большинства химических веществ. Поэтому плохо окрашивается. Чтобы споры прокрасились, требуется специальная обработка препарата. Его обрабатывают (протравливают) кислотой, затем красят концентрированным раствором красителя при высокой температуре. При этом оболочки спор так прочно адсорбируют краску, что не обесцвечиваются при последующей обработке слабым раствором кислоты.

Существует несколько способов окраски спор, основанных на том, чтобы сделать проницаемой для краски их плотную оболочку – это метод по Цилю-Нильсену, Пешкова (прил. 2.2.; 2.5.(в): 4.7.; 4.12.)

Методы окраски жгутиков бактерий – жгутики окрашиваются с трудом, поэтому для их окраски применяют протравы, которые увеличивают толщину жгутиков и повышают возможность их окраски. При изготовлении препаратов для обнаружения жгутиков необходимо пользоваться очень чистыми хорошо обезжиренными стёклами.

Рекомендуется работать с новыми покровными стёклами, которые предварительно 10 мин кипятят в хромовой смеси. После кипячения стёкла промывают в течение 5 мин в слабом растворе гидроксида натрия (NaOH), после чего обильно промывают водой, ополаскивают спиртом и помещают в банки со смесью Никифорова. Из банок стёкла вынимают чистым пинцетом, смесь Никифорова удаляют прожиганием стекла на огне.

Подготовка материала: для подготовки культуры рекомендуется ежедневно несколько дней подряд делать пересевы на свежую питательную среду (в жидкую среду или в конденсационную воду свежей скошенной агаризованной среды). В день просмотра материал берут петлей и переносят в пробирку с 5-6 мл стерильной водопроводной воды, нагретой до 37 °С. Не рекомендуется размешивать бактериальную массу в воде петлей, она сама должна разойтись в ней в течение 30-60 мин. Прежде чем приступить к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висючей капле. В случае отсутствия подвижности пробирку оставляют в термостате на 1½- 2 сут.

Для **окрашивания жгутиков** предложено несколько методов, общим этапом для которых является протравливание препарата и последующая окраска (чаще карболовым раствором фуксина). В результате этого на жгутиках происходит осаждение красителя, благодаря чему одновременно достигается как увеличение их толщины, так и уменьшение прозрачности (прил.4.13.)

Негативное окрашивание в электронной микроскопии. Метод заключается в обработке микрочастиц или макромолекул на пленке-подложке растворами соединений тяжёлых металлов (например, урана), в результате чего частицы будут видны как светлые пятна на тёмном фоне.

Процесс приготовления образцов для негативного контрастирования:

1. Исследуемые молекулы наносят на тонкую плёнку углерода (практически прозрачную для электронов).
2. Затем её смачивают концентрированным раствором солей тяжёлых металлов, например, уранилацетата.
3. После высушивания образца тонкая плёнка солей тяжёлых металлов равномерно покрывает углеродную подложку, за исключением участков, занятых адсорбированными макромолекулами.

4. Вещество макромолекул более проницаемо для электронов по сравнению с прилежащими участками, покрытыми солями тяжёлых металлов; за счёт этого возникает обращённое или негативное изображение молекулы.

Негативное окрашивание используется для просмотра вирусов, бактерий, бактериальных жгутиков, биологических мембранных структур и белков или белковых агрегатов.

Занятие № 1

Приготовления красок, необходимых для лабораторной работы.

1. Приготовить спиртовой раствор **генцианвиолета**. Приложение: 2.4.; 3.
2. Приготовить раствор сафранина. Приложение: 2.12.
3. Приготовить йодный раствор Люголя. Приложение: 2.6.

Материал и оборудование:

Генциан фиолетовый (C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃) *	20,0 г
Спирт этиловый 95 % (C ₂ H ₅ OH)	200 мл
Сафранин 2,5 % (C ₂₀ H ₁₉ N ₄ Cl) **	25 мл
Спирт этиловый 95 % (C ₂ H ₅ OH)	100 мл
Йод кристаллический, хч	1,0 г
Калия иодид (KI) хч	2,0 – 5,0 г
дН ₂ О	1100 мл.
Ступка с пестиком	1 шт.
Фильтровальная бумага	
Пинцет анатомический	
Ёмкости стеклянные для окраски препаратов	

*-генциан фиолетовый, метиловый фиолетовый кристаллический фиолетовый принадлежат к красителям трифенилметанового ряда, что позволяет применять их в одинаковой степени для окраски по методу Грама.

** - в качестве второго красителя можно использовать фуксин Пфейффера (прил.2.2.), который лучше прокрашивает, например, клетки грамотрицательных анаэробов.

Занятие № 2

Изучить методы окраски микроорганизмов; обнаружить бактерии различных морфотипов в готовых фиксированных препаратах.

1. Окрасить по Граму и Циля-Нильсону выданные препараты. Приложение: 4.1., 4.12.

2. Определить стадии капсулирования в готовых окрашенных мазках по Романовского-Гимза.

3. Микроскопировать с объективом 100х с использованием иммерсионного масла.

4. Отдифференцировать основные формы бактерий и тинкториальные свойства исследуемых препаратов.

5. Сделать вывод о способности бактерий к споро- и капсулообразованию.

Оборудование и реактивы

Готовые фиксированные препараты микроорганизмов, красители, спирт этиловый 95%, колба с водой, микроскоп с конденсором светлого поля, иммерсионное масло, 70⁰ этиловый спирт, пинцет, мостик, фильтровальная бумага, сухие салфетки, спиртовка, спички.

Техника безопасной работы

1. Порядок работы со спиртовками.

1.1. Открыть крышку спиртовки и с помощью пинцета поправить фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.

1.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени её использования.

1.3. Необходимо помнить:

- нельзя приподнимать держатель фитиля в течение всего времени использования спиртовки,

- нельзя наклоняться над горячей спиртовкой,

- нельзя подносить к ней легко воспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т. п.),

- нельзя оставлять без присмотра горящую спиртовку.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСЯЩИХ РАСТВОРОВ:

1.1. Насыщенный спиртовой раствор различных красок получают растворением 1 г его в 10 мл 95 % этилового спирта, дают краске отстояться одни сутки при комнатной температуре или два часа в термостате при 37°C, чтобы она созрела, после чего краска готова к употреблению. Краска обычно полностью не растворяется, и на дне флакона остаётся небольшой осадок. Фильтрация раствора не обязательна. При повседневной лабораторной работе необходимо иметь насыщенные спиртовые растворы фуксина, генцианвиолета, метилового синьки. Насыщенные растворы могут храниться долгое время во флаконах из тёмного стекла.

1.2. Рабочий водно-спиртовой раствор краски получают, смешивая 1 мл насыщенного спиртового раствора с 10 мл дистиллированной воды, смешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Краска получается не очень стойкая, поэтому лучше употреблять свежеприготовленные растворы.

Для повышения красящей способности в качестве протравы к водно-спиртовому раствору красок добавляют карболовую кислоту.

2. РЕЦЕПТЫ НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБИТЕЛЬНЫХ КРАСОК

2.1. Феноловый фуксин Циля

Основной фуксин – 1 г;

Спирт этиловый 95 % – 10 мл;

Фенол кристаллический (карболовая кислота) – 5 г;

Глицерин – 3-4 капли;

Вода дистиллированная – 100 мл.

Фуксин с кристаллами фенола и несколькими каплями глицерина растирают в ступке до гомогенной массы, понемногу добавляя спирт, затем, не прекращая перемешивания, постепенно добавляют дистиллированную воду. Краситель выдерживают 48 ч при комнатной температуре и фильтруют. Срок хранения длительный, во флаконах из тёмного стекла. Его употребляют для окраски спор и кислотоустойчивых бактерий, трудно воспринимающих краску.

2.2. Фуксин Пфейфера (разведённый фуксин) – 1 мл фуксина

Циля смешивают с 9 мл дистиллированной воды. Раствор нестойкий, поэтому его готовят непосредственно перед окраской препаратов. Оставлять можно не дольше следующего дня. Используют для простой окраски мазков и дополнительной окраски их по методу Грама.

2.3. Карболовый генцианвиолет – 10 мл насыщенного спиртового раствора генцианвиолета смешивают со 100 мл 5%-ной карболовой кислоты или 1 г генцианвиолета растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты, постепенно добавляют 10 мл 95% этилового спирта и 100 мл дистиллированной воды.

Срок хранения растворов при температуре от 2 °С до 10°С – не более 6 мес.

2.4. Спиртовой раствор генцианвиолета – 20,0 г генциан фиолетового растворяют, растирая в ступке с добавлением 200 мл 95% этилового спирта, затем добавляют воду и фильтруют готовый раствор.

2.5. Метиленовый синий

а) Метиленовый синий – насыщенный спиртовый раствор:

Метиленовый синий – 8-9 г.

Спирт этиловый 95 % – 100 мл.

б) Метиленовый синий – спиртово-водный раствор:

1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего разбавляют 30 мл дистиллированной воды.

в) Метиленовый синий по Леффлеру:

Насыщенный 8% спиртовый раствор метиленового синего – 30 мл. Дистиллированная вода – 100 мл.

1% раствор едкого калия (КОН) – 1 мл.

Насыщенный 8% раствор метиленового синего фильтруют через бумажный фильтр, прибавляют раствор едкого калия и разбавляют дистиллированной водой. Раствор красителя может храниться во флаконе с притертой стеклянной пробкой, в течение длительного времени, не изменяя свойств. Краска очень прочная, причём красящая способность старой краски выше, чем свежеприготовленной.

г) Водный раствор метиленовый Сини – 1 г метиленовой сини растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Срок хранения раствора при температуре от 2°С до 8°С – не более 1 мес.

2.6. Раствор Люголя – 2 г йодистого калия растворяют в 2 мл дистиллированной воды, прибавив 1 г кристаллического йода и убирают в термостат при 37°С и оставляют на несколько часов до полного его растворения, можно и на сутки. Затем объём доводят водой до 300 мл.

Раствор Люголя должен иметь слабощелочную или нейтральную реакцию. При кислой реакции его нейтрализуют (по лакмусу) двууглекислой содой.

Срок хранения раствора при температуре от 2°C до 10°C в склянке из тёмного стекла – не более 30 сут.

2.7. Краситель Романовского-Гимзы

Азур I – 3,772 г.

Эозин – 2,165 г.

Метиленовая синька (медиц.) – 1,563 г.

Метанол (ЧДА) – 750 мл.

Глицерин (ЧДА) – 256 мл.

Красящую смесь Романовского-Гимзы, которая имеет в основе краску Романовского-Райта, в виде порошка (коммерческий краситель) растворяют в смеси равных объёмов метилового спирта и глицерина (800 мг красителя на 100 мл растворителя). Краситель растворяется плохо, поэтому лучше его растереть с растворителем в количестве 300 мг на 100 мл, а затем, помешивая, добавлять краситель до получения нужной концентрации.

Приготовление красителя иногда занимает несколько дней. Важно в качестве растворителей использовать химически чистый метиловый спирт и глицерин, так как примеси ухудшают свойства красителя. Вместо метилового спирта можно применять 95 % этиловый спирт. Приготовленную красящую смесь хранят в сухом прохладном месте в плотно закрытом сосуде.

Краситель Романовского-Гимзы также продаётся в готовом виде. Непосредственно перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды (рН 7,0-7,2) прибавляют 10 капель имеющегося в продаже красителя Романовского-Гимзы.

2.8. Раствор бриллиантового зелёного (раствор малахитового зелёного)

а) **1% водный раствор** готовят путем растворения 1 г малахитового зелёного в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Срок хранения раствора при температуре от 2°C до 8°C – не более 1 мес.

б) **Спиртowo-водный раствор:** 10 г малахитового зелёного смешивается с 80 мл дистиллированной воды и 20 мл 95 % этанола.

в) **Бриллиантового зелёного спиртовый раствор**

Бриллиантовый зелёный – 0,5 г.

Этиловый спирт 95 % – 100 мл.

Краска хранится длительное время во флаконе темного стекла в темноте, закрытая стеклянной притёртой или резиновой пробкой.

2.9. Раствор Ребигера

Растворяют 15-20 г генцианвиолета в 100 мл 40%-го формалина. Раствор выдерживают при комнатной температуре в течение нескольких часов, после чего фильтруют.

2.10. Тушь для окраски препаратов по Бурри

Тушь черная – 1 мл.

Дистиллированная вода – 9 мл.

К 1 объёму черной туши прибавляют 9 объёмов дистиллированной воды. Разведённую тушь наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 15-20 минут при 2000-3000 об./мин для осаждения крупных частиц туши. Сливают надосадочный слой туши и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. и 110⁰С в течение 30 минут. Вместо стерилизации можно добавлять к туши несколько капель формалина. Подготовленную таким образом тушь выдерживают две недели в спокойном состоянии, пока все крупные частицы не осядут на дно. Для приготовления препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшейся жидкости.

Кроме жидкой туши для негативного окрашивания можно использовать водные растворы конгорот 3%, нигрозина (10%) и некоторых других красителей.

Окрашивание негативными красителями можно проводить двумя способами: либо раствор красителя наносить на сухой фиксированный мазок, после промывки водой и высушивания микроскопировать; либо каплю исследуемой суспензии микробов смешивают с красителем, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. И в том, и в другом случае микробные клетки будут бесцветными.

2.11. 2% сафранин водный

Сафранин – 2,0 г.

Вода дистиллированная – 100 мл.

Сафранин отвешивают в заданном количестве, ссыпают в воронку с бумажным фильтром и заливают кипящей водой. Срок хранения раствора при температуре от 2⁰С до 8⁰С – не более 1 мес.

2.12. 2,5% сафранин спиртовой

Сафранин – 2,5 г.

Спирт этиловый 95 % – 100 мл.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОПИТАННОЙ ГЕНЦИАНВИОЛЕТОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ ДЛЯ ОКРАСКИ МИКРОБОВ ПО ГРАМУ В МОДИФИКАЦИИ СИНЕВА.

Для получения более чистых препаратов, краску можно наливать на мазок, покрытый фильтровальной бумагой, или использовать фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем и высушенную.

Для приготовления бумажек, фильтровальную бумагу предварительно испытывают на пригодность. Для этого полоску фильтровальной бумаги погружают в спиртовой раствор красителя (карболового генцианового фиолетового), высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно, без пятен. Если небольшой кусок такой бумаги положить на стекло с несколькими каплями воды, она сразу же пропитается водой и краситель через несколько секунд перейдёт в раствор. Бумагу для пропитывания нарезают полосками (шириной 2,5–3 см, длиной 30 см).

Готовую краску выливают в тарелку и погружают в него нарезанную полосками фильтровальную бумагу на 1-2 мин. Пропитанная краской бумага подсушивается, нарезается кусочками (2x4 см) и сохраняется в тёмных склянках с притёртой пробкой. Срок хранения неограниченный.

Окрашивание: на фиксированный мазок накладывают полоску сухой пропитанной красителем фильтровальной бумаги, а затем на бумагу пипеткой наносят несколько капель дистиллированной воды и пинцетом или шпателем прижимают фильтровальную бумагу к стеклу. Краситель вымывается из бумаги и окрашивает мазок. По истечении времени окрашивания, фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают осторожно струёй воды, высушивают и микроскопируют.

В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остаётся светлым и чистым, а окрашенными будут только микробные клетки.

4. МЕТОДИКИ ОКРАШИВАНИЯ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬ БАКТЕРИИ ПО БИОХИМИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ ИХ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

4.1. Окрашивание по методу Грама:

1. На фиксированный мазок поместить фильтровальную бумагу пропитанную генциан – фиолетовым в течение 2 мин.

2. По окончании окраски бумагу снять пинцетом и, не промывая мазок водой, налить раствор Люголя на 2 мин.

3. Слить раствор Люголя и, не промывая водой, налить 95 % этиловый спирт и обесцветить до прекращения отхождения фиолетовых струек краски 30 – 60 сек.

4. Ополоснуть мазок водой.

5. Докрасить мазок в течении 2 минут раствором фуксина.

6. Промыть мазок водой, высушить и микроскопировать.

Грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый и красный.

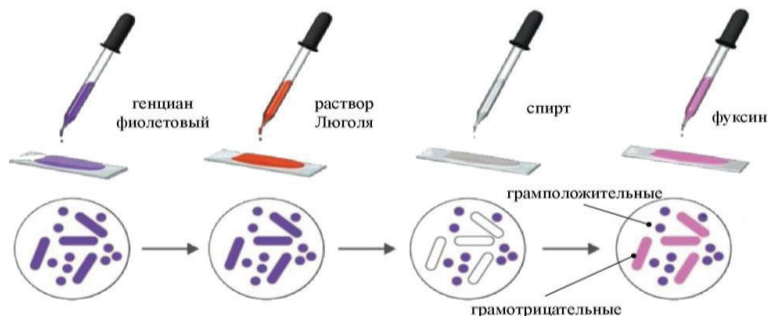


Рис. 33 Последовательность окрашивания по Граму
(<https://dzen.ru>)

4.2. Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов

Метод основан на разрушении клеток грамотрицательных бактерий в щелочной среде (3% растворе КОН). Образующаяся слизь свидетельствует о том, что КОН разрушает бактериальную клеточную стенку.

Материалы:

- 1) предметное стекло;
- 2) 3% раствор КОН;

3) бактериологическая петля;

4) спиртовка.

Техника окраски:

1. На предметное стекло наносят каплю 3%-ного раствора КОН и 1 петлю 24-часовой исследуемой агаровой культуры, тщательно перемешивают.

2. Через 5-10 с медленно приподнимают бактериологическую петлю на высоту 2-3 см.

Оценка результата. Грамотрицательные культуры через 5-7 с при движении петли вверх образуют слизистый след длиной 1-2 см; если слизь не образуется, то тестируемая культура грамположительная.

4.3. По способу Бурри – препарат заливают жидкой тушью. Тушь не является истинным красителем, поэтому тела микробов остаются неокрашенными; вследствие чего получается, как бы негативное их изображение. Микробные клетки видны в виде бесцветных телец, на тёмном фоне препарата.

На предметное стекло на расстоянии одной трети от левого края нанести каплю туши (в разведении 1:10). В эту каплю бактериологической петлёй осторожно внести культуру. Затем край отшлифованного стекла (ширина стекла должна быть меньше ширины предметного стекла) поставить к капле под углом 45°, прижать к предметному стеклу и продвигнуть вперёд, тем самым распределить тушь с культурой в тонкий мазок.

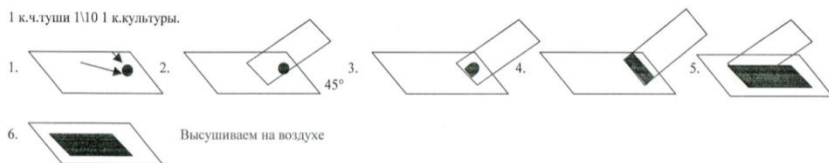


Рис. 34 Приготовление мазка для выявления капсулы бактерий (<https://studopedia.org>)

Фон препарата окрашен в тёмно-дымчатый цвет, микробные тела и их капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными, вследствие чего этот способ получил название негативного.

4.4. Выявление капсул методом Бурри–Гинса

Мазок, окрашенный тушью по Бурри, фиксируют в течение 30 мин в спирте с добавлением 3 % H_2O_2 . После отмывания водой кра-

сят 5 мин фуксином Пфейффера или синькой Леффлера, промывают и высушивают.

Бактерии – красные или синие, капсулы – неокрашенные, фон – чёрный.

4.5. Выявление капсулы методом Михина

Фиксированный в 95 % этиловом спирте с 3 % H_2O_2 в течение 30 мин мазок окрашивают синькой Леффлера в течение 2–3 мин, подогревая до появления паров. Краску быстро смывают водой, а мазок высушивают бумагой. Краску необходимо смывать водой очень быстро, так как вода извлекает из капсулы красящее вещество.

Капсулы – светло-розовые, бациллы – темно-синие.

4.6. Выявление капсулы по Ребигеру

На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор Ребигера и выдерживают 30–60 сек, затем промывают водой и высушивают.

В мазках из свежего патологического материала капсула вокруг микроба окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки – в темно-фиолетовый.

4.7. Обнаружение спор по Пешкову

- Мазок фиксируют в 95 % этиловом спирте с 3 % H_2O_2 в течение 30 мин, затем 20 сек окрашивают синькой Леффлера, нагревая стекло над пламенем горелки до закипания краски. Продолжительность окраски, считая с момента закипания, 10-20 с. Не следует допускать высыхания красителя (по мере испарения добавляют новые порции красителя, предварительно охлаждая стекло).

- Дать препарату остыть, а затем промыть водой.

- Докрашивают 0,5%-м водным раствором нейтрального красного в течение 30 сек. Краску смывают водой и мазок высушивают.

Споры окрашиваются в голубой или синий цвет, бактериальные клетки – в красный или розовый.

4.8. Окраска мазков-отпечатков по Романовскому–Гимзе

Фиксация мазка проходит в течение 40–60 мин в 95 % этиловом спирте. Приготовленный раствор краски тотчас же наливают на фиксированный мазок или лучше предметное стекло с окрашиваемым препаратом погружают в стаканчик с краской. Окрашивание продолжается не менее 1 ч (можно до 24 ч). Препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

Для ускоренной окраски мазков применяют метод, основанный

на одновременной фиксации и окраске мазков. На мазок наносят 20 капель краски Романовского-Гимзы, смешанной в равных частях с метиловым спиртом или химически чистым ацетоном. Через одну минуту к краске приливают 10 мл подщелоченной (рН 7,2) дистиллированной воды. Осторожным покачиванием краску смешивают с водой. Через 10–15 мин краску сливают, мазок промывают водопроводной водой, высушивают и микроскопируют.

Бактерии туляремии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет и легко определяются по размерам, форме и скученному расположению и четко дифференцируются от окружающего светло-сиреневого клеточного фона.

4.9. Окрашивание препаратов по способу Козловского

1. Нетолстый мазок из культуры или отпечаток из органов на предметном стекле высушивают на воздухе, затем фиксируют в фиксирующей жидкости.

2. Покрывают 2%-ным водным раствором сафранина и подогревают при движении стекла над пламенем горелки в течение 1,5–2 минут, до появления пузырьков газа.

3. Затем мазок промывают водой, окрашивают 1%-ным водным раствором малахитовой зелени в течение 20–30 секунд, опять промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Малахитовую зелень можно заменить 1%-ным раствором бриллиантовой зелени или метиленовой синьки.

При этом бруцеллы остаются красного цвета, а остальная микрофлора окрашивается в зелёный цвет.

4.10. Простая окраска по методу Леффлера

Для получения более чистых препаратов, краску можно наливать на мазок, покрытый фильтровальной бумагой, или используют фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем и высушенную. В таком случае на фиксированный мазок накладывают полосу сухой пропитанной красителем фильтровальной бумаги, а затем на бумагу пипеткой наносят несколько капель дистиллированной воды и пинцетом или шпателем прижимают фильтровальную бумагу к стеклу. Краситель вымывается из бумаги и окрашивает мазок. По истечении времени окрашивания, фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают осторожно струёй воды, высушивают и микроскопируют. Также можно на фиксированный и высушенный мазок пастеровской пипеткой нанести краску в таком количестве, чтобы

она покрывала весь мазок. Время окрашивания 1-2 мин.

В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остаётся светлым и чистым, а окрашенными будут только микробные клетки.

4.11. Этапы окраски по Цилю-Нильсену:

- На зафиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу и наносят фуксин Циля. Затем предметное стекло нагревают над горелкой до момента появления паров (обычно в течение 3-5 минут) и дают остыть. Эту процедуру повторяют 2-3 раза. После остывания предметного стекла снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и после промывания водой опускают на 1-2 секунды в стакан с 5% серной кислотой и вновь хорошо промывают водой. Докрашивают в течение 3-5 минут щелочным метиленовым синим, промывают водой и высушивают.

Окраска бактерий по Цилю-Нильсену:

- если бактерии кислотоустойчивые, то они не обесцвечиваются и имеют красный цвет. Удержание цвета кислотоустойчивыми бактериями обусловлено содержанием в их клеточных стенках липидов – они удерживают окислитель при обесцвечивании кислотой;

- если бактерии некислотоустойчивые, то окрашиваются в голубой цвет посредством метиленового синего.

4.12. Для обнаружения спор в некоторых образцах внешней среды применяют окрашивание карболовым фуксином по Цилю-Нильсену.

После фиксации мазка на стекло кладут полоску фильтровальной бумажки и на неё наливают карболовый фуксин Циля. Мазок с краской подогревают над пламенем спиртовки до появления паров (но не до кипения) и краску оставляют без подогревания еще на 2–3 мин. Бумажку удаляют пинцетом, краску сливают, препарат промывают водой. Затем обесцвечивают 5 % серной кислотой до желтоватого оттенка (в течение 3–5 с). Тщательно отмывают препарат водой, ополаскивают 5–10 с 95 % этиловым спиртом и вновь промывают водой. Докрашивают мазок в течение 2–3 мин метиленовой синью Леффлера, смывают водой и просушивают. Препарат просматривают в микроскопе с иммерсионной системой. В мазках наблюдают палочки синего цвета.

Споры, в зависимости от степени их жизнеспособности, могут окрашиваться следующим образом:

1) розовые с более интенсивной окраской по периферии – жизнеспособные;

2) равномерно окрашенные в красный цвет – слабо жизнеспособные;

3) синие – нежизнеспособные.

4.13. Окраска жгутиков по методу Леффлера

Суспензию 12-16 часовой культуры бактерий наносят на предметное стекло и сушат при комнатной температуре. Далее препарат обрабатывают протравителем. Время обработки зависит от состава протравителя. В настоящее время используют один из двух составов, которые готовят за 1-2 сут перед использованием:

1-ый состав: 12 г танина растворяют при нагревании в 48 мл воды, добавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса (FeSO_4) и 6 мл насыщенного раствора фуксина в 95 % этиловом спирте. Смесь хранят во флаконе с притёртой пробкой в тёмном месте (в течение нескольких месяцев), перед работой фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Наносят на препарат на 3-5 мин.

2-ой состав: смешивают 20%-ный водный раствор танина, 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина и 5,5 мл насыщенного водного раствора сульфата закисного железа (соль Мора). Приготовленную смесь перед работой фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Наносят на 30-50 сек, нагревая до появления паров или выдерживают при комнатной температуре 15-20 мин.

Далее докрашивают препарат в течение 3-4 мин карболовым фуксином Циля (разведённым водой 1:1) или раствором, содержащим 1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина и 10 частей воды (растворы фуксина перед работой фильтруют через складчатый бумажный фильтр) при лёгком нагревании без появления пара.

Затем препарат промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом с иммерсией.

Жгутики и клетки бактерий окрашиваются в розовый цвет.

4.14. Прямой метод флюоресцирующих антител.

Метод прост в исполнении и обладает высокой специфичностью. Сущность метода заключается в том, что на предметное стекло с фиксированным на нем мазком, содержащим антиген, наносят небольшое количество (2-3 капли) меченой флюорохромом сыворотки или глобулинов в рабочем титре. Препарат помещают в чашку Петри с комочком влажной ваты или фильтровальной бумаги (влажная ка-

мера) и выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 20 мин, при комнатной температуре – 30-40 мин. Затем мазок промывают каким-либо буферным раствором и дистиллированной водой (можно только дистиллированной водой). Высушивают на воздухе или в термостате. Перед просмотром под иммерсионной системой, на мазок наносят каплю забуференного глицерина (9 частей глицерина с одной частью фосфатного буфера) и накрывают покровным стеклом. Исследование мазка проводят под люминесцентным микроскопом, используя нефлуоресцирующее масло.

Если антиген и антитела специфичны, то на тёмном фоне отчетливо видны салатново-зелёные клетки бактерий, светящиеся за счёт адсорбированных на них антител меченых флюорохромом. Специфически люминесцирующие микроорганизмы должны обладать характерной морфологией, иметь увеличенные размеры (по сравнению с их размерами в световом микроскопе) и более яркое свечение периферической части клетки.

Если же антитела были неспецифичны антигену (или антигена в мазке не было), то свечение отсутствует, так как антитела удаляются с препарата при промывании водой. Неспецифическая флюоресценция характеризуется равномерным свечением всего тела клетки. Морфологические и структурные особенности микроорганизмов позволяют отчетливо дифференцировать их от бесструктурных люминесцирующих конгломератов, которые могут наблюдаться в препаратах.

4.15. Метод Романовского-Гимзы для обнаружения капсулы

Препарат, фиксированный в этаноле с 3 % H_2O_2 , кладут мазком вниз в чашку Петри с подставками (деревянные или стеклянные палочки). Под препарат наливают краску Романовского-Гимзы (концентрированную). Выдерживают 35 минут. Препарат слегка промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: капсула – розовая, клетка – темно-синяя.

5. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ В АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ВКЛЮЧАЕТ СЛЕДУЮЩИЕ ЭТАПЫ:

5.1 Выращивание штаммов микроорганизмов на твёрдых питательных средах в течение 48 часов при температуре 28°C (для

Y.pestis) и 37 °С (для остальных видов бактерий).

5.2 Обеззараживание клеток бактерий нельзя проводить табельными методами (кипячение, обработка формалином, фиксация спиртом), приводящими к нарушению морфологии клеток и поверхности клеточной стенки. При исследовании данным методом агаровую культуру неспорообразующих микроорганизмов для обеззараживания суспендируют в 1-2 мл 2,5% глутаральдегидного фиксатора (рН 7,2), а спорообразующую – в 1-2 мл 5% глутаральдегидного фиксатора (рН 7,5-8,5) и доводят до концентрации, равной 10 единичному ОСО (**оптический отраслевой стандарт мутности**) для возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы и 5 единиц ОСО 42-28-86 для возбудителя холеры. Взвеси микроорганизмов инкубируют в течение 2 ч при температуре 4°С – для неспорообразующих микроорганизмов и в течение 3 ч при температуре 25°С – для спорообразующих микроорганизмов.

5.3 Осаждение клеток центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15–20 минут.

5.4 Отмывка осадка дважды стерильной дистиллированной водой и хранение при температуре 4С.

5.5 Подготовка к атомно-силовой микроскопии. Полученную взвесь клеток в объёме 4 мкл помещают на поверхность подложки и высушивают на воздухе. Материал подложки можно варьировать в широких пределах в зависимости от поставленных задач.

Список используемой литературы

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – 2021.
2. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие для СПО / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина [и др.]. – 6-е изд., испр. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 588 с. – ISBN 978-5-8114-7723-4.
3. Основы микроскопии / Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров; Минобрнауки России, университет ИТМО – Санкт-Петербург – 2020 г.
4. Микробиология: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин; Минобрнауки России, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019 – 107 с. - ISBN 978-5-7996-2618-1.
5. Материалы XI международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум 2019», научное обозрение № 5, 2019.
6. Методические указания «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» / Сост.: Горельникова Е.А. // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2018. – 66 с.
7. Методические указания МУК 3.1.7.3402–16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза». – М., 2017.
8. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник / Под ред. В.В. Зверева, А.С. Быкова. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2016 – 816 с. SBN 978-5-9986-0227-6.
9. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33675-2015 – «Лабораторная диагностика бруцеллеза» – бактериологические методы. – Москва, Стандартинформ, 2016.
10. Методические указания МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности». – М., 2013.
11. Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие / Н. А. Клёнова. - Самара: Изд-во Самарский университет, 2012. – 102 с.
12. Литусов Н.В. Морфология и структура бактерий. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012. – 50 с.

13. Методические указания МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». – М., 2008.

14. Унифицированный метод микроскопического выявления кислотоустойчивых микобактерий: Руководство для клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений / В.В. Ерохин, В.И. Голышевская, С.А. Попов, В.А. Пузанов, Г.В. Еvgущенко, Э.В. Севастьянова, Л.П. Мартынова, О.А. Иртуганова. – Москва – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 132 с. – ISBN 978-5-94789-320-5.

15. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А.Воробьев, Ю.С.Кривошеин, В. П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 464с. – ISBN 5-7695-2550-9.

16. Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине: Справочник. – Барнаул: Азбука, 2003. – 40 с.

17. Основы лабораторной техники при работе с возбудителями особо опасных инфекций. – Алма-Ата, 1982.

18. Руководство по эксплуатации Микромед. – С-Петербург, 2023. – инструкция микроскоп ECLIPSE 80i.

Перечень интернет-ресурсов

1. <https://ru.wikipedia.org/>
2. <https://studfile.net/>
3. <https://electrosam.ru/glavnaja/slabotochnye-seti/oborudovanie/mikroskop/>
4. <https://moodle.kstu.ru/mod/book/view.php?id=30657&chapterid=7114>
5. <https://bio-media.ru/info/articles/mikrobiologiya-v-detalyakh-razmery-i-formy-bakteriy/>
6. <https://old.bigenc.ru/physics/text/1839395>

Подписано в печать 05.09.2025.
Формат 60x84/16. Усл.п.л. 4,25. Тираж 100 экз. Заказ № 4904.

Отпечатано: ИП Копыльцов П.И. 394052, Россия, г. Воронеж,
ул. Маршала Неделина, д. 27, кв. 56. Тел.: 8 (950) 765 69 59