

Тема занятия: Организация работы в микробиологической лаборатории

1. Знакомство с микробиологической лабораторией.
Правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Техника безопасности при работе с инфицированным материалом.
3. Микроскопические методы исследования морфологии микроорганизмов.

- **Домашнее задание:** Литература:
Камышева К.С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований. Уч. пособие. «Феникс», 2015 с 21-28,46-47,50-51.



- Микробиологические лаборатории организуются при больницах и санитарно-эпидемиологических станциях (СЭС).
- Существуют также специальные лаборатории, в которых работают с возбудителями особо опасных инфекций, вирусологические лаборатории и др.
- Микробиологические лаборатории занимаются бактериологической диагностикой инфекционных заболеваний, исследуя испражнения, мочу, кровь, мокроту больных с целью обнаружения патогенных микроорганизмов — возбудителей заболевания

- Помимо этого, в микробиологических лабораториях проводят санитарно-бактериологические исследования воды, воздуха, смывов с окружающих предметов, рук, пищевых продуктов для обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов, указывающих на загрязнение патогенными микробами.
- При необходимости в объектах внешней среды определяют наличие патогенных микробов.

- В связи с тем что в микробиологических лабораториях работают с заразным материалом, помещение их должно быть изолировано от других больничных помещений, пищеблоков, жилых комнат. В состав лаборатории входят:
 - 1) лабораторные комнаты для проведения микробиологических исследований;
 - 2) моечная;
 - 3) препараторская для подготовки лабораторной посуды, приготовления питательных сред и других вспомогательных работ;
 - 4) автоклавная; 5) комната, где производят прием материала и выдачу результатов исследования. Лабораторных животных, необходимых для постановки биологических проб, содержат в специальном изолированном помещении — виварии. В лабораториях, где объем работ невелик, можно объединить моечную и препараторскую, исключить комнату для приема анализов и т. д.









- Лабораторные комнаты должны быть просторными и светлыми, желательно с ориентацией окон на север или северо-запад, так как для работы необходим рассеянный свет.
- Стены окрашивают светлой масляной краской, пол покрывают линолеумом, лабораторные столы — пластиком или стеклом, что позволяет их легко дезинфицировать.

- В лабораторной комнате оборудуют застекленный бокс с предбоксом для проведения работ в стерильных условиях.. В боксе помещают бактерицидную лампу, стол, табуретку.
- В лабораторных комнатах находится специальное оборудование: термостат , холодильник, шкафы, центрифуга и др.

**СТЕРИЛЬНЫЙ
БОКС**



Бокс оснащен передаточным шлюзом и съемным вытяжным зонтом для подключения к системе активной вытяжной вентиляции.







- Большое значение имеет правильная организация рабочего места. Рабочий стол устанавливают у окна таким образом, чтобы свет падал сбоку или прямо.
- На столе должны находиться только необходимые для работы предметы: спиртовка или газовая горелка, штативы, бактериологические петли, банка с дезинфицирующим раствором.



- Персонал во время работы должен строго соблюдать следующие правила:
- 1) находиться в лаборатории можно только в специальном халате и шапочке;
- 2) в лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, хранить там продукты, принимать пищу;
- 3) исследуемый материал поступающий в лабораторию, рассматривается как заразный; его ставят на специальный поднос и обрабатывают снаружи дезинфицирующим раствором;

- 4) во время работы необходимо соблюдать осторожность, следить за чистотой рук, применять технические приемы, исключая контакт с заразным материалом;
- 5) исследуемый материал, отработанные культуры подлежат уничтожению;
- 6) по окончании работы руки, инструменты, рабочее место обрабатывают дезинфицирующим раствором. Культуры микробов, необходимые для дальнейшей работы, ставят в холодильник или сейф и опечатывают.

- Уборка помещений лаборатории. Уборку проводят ежедневно до и после работы влажным способом с применением дезинфицирующих средств. Пол протирают 2—5% раствором карболовой кислоты или хлорамина.
- Стены, инвентарь и полы один раз в неделю моют горячей водой с мылом. Бокс убирают в конце рабочего дня, а утром перед работой облучают бактерицидными лампами.

- Мытье лабораторной посуды. Посуду, содержащую заразные материалы и культуры микробов, обеззараживают в автоклаве
-
- Нельзя обрабатывать посуду дезинфицирующим раствором, так как даже следы его задерживают рост микробов. Стеклянную посуду моют ершами с применением бикарбоната натрия, полужидкого мыла или стирального порошка. Для устранения белого налета стеклянную посуду помещают на 30—40 мин в 5—10% раствор хлористоводородной кислоты. Сильно загрязненную посуду опускают в слегка подогретую хромовую смесь. Новую лабораторную посуду кипятят 15 мин в воде с мылом, прополаскивают,

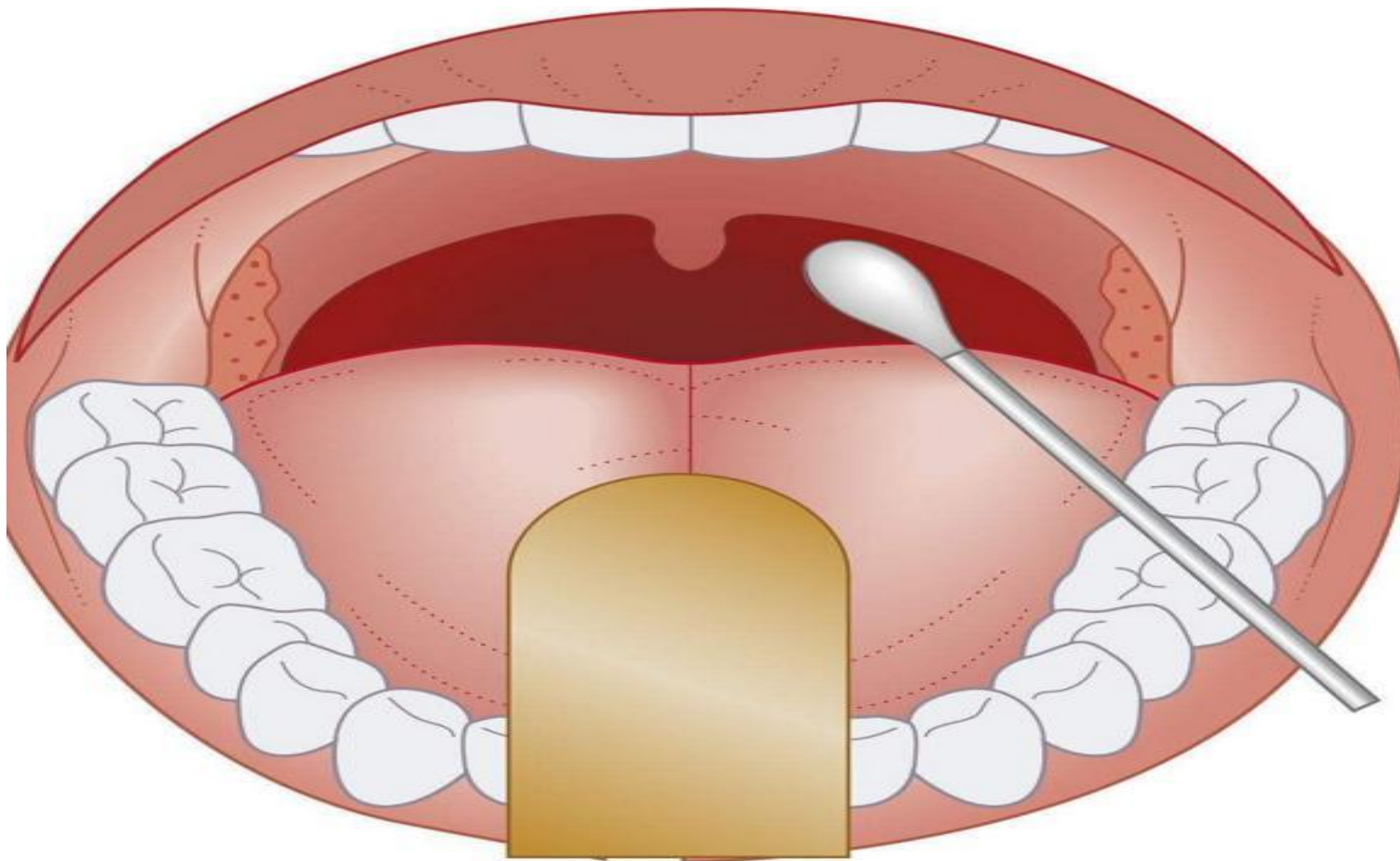
- погружают в теплый 1—2% раствор хлористоводородной кислоты и кипятят 10—15 мин. В пипетки вводят кусок проволоки, на конец которой плотно накручивают кусок ваты, и тщательно протирают их.
- Предметные и покровные стекла должны быть хорошо обезжирены (нанесенная на стекло капля воды должна растекаться).
- Стекла, бывшие в употреблении, загрязненные краской и маслом, опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем промывают проточной водой и кипятят в 5% растворе бикарбоната натрия 30—40 мин.
- Вымытую посуду ставят в сушильный шкаф или сушат на воздухе, пробирки закрывают пробками из ваты, заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу или печи Пастера.

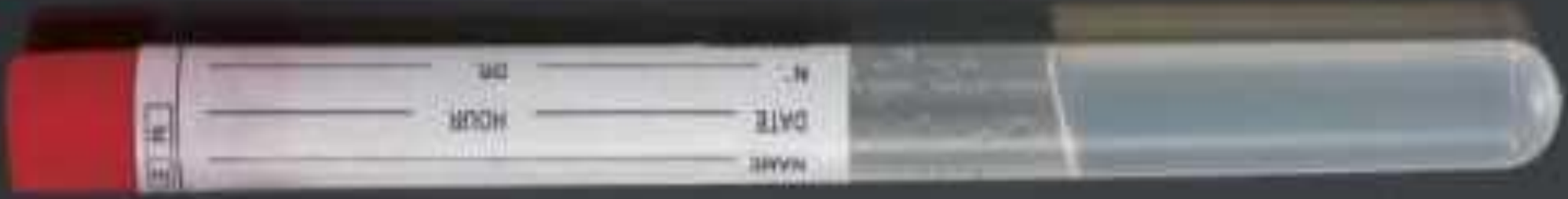
- Техника взятия и доставки материала в микробиологическую лабораторию. Успех бактериологического исследования зависит от правильности взятия материала и своевременной доставки его в лабораторию.
- В зависимости от характера патологического процесса, места максимальной (избирательной) локализации возбудителя и пути его выделения в окружающую среду исследуют
- мокроту (при заболеваниях органов дыхания), испражнения (при желудочно-кишечных инфекциях), мочу (при поражении почек и мочевыводящих путей), гнойное отделяемое (из гнойных очагов), кровь (при кровяных инфекциях).

- Материал необходимо брать в стерильную посуду с соблюдением правил, обеспечивающих стерильность.

Испражнения собирают в стерильные картонные тарелки или судно, предварительно обработанное раствором хлорной извести и тщательно промытое горячей водой для уничтожения следов дезинфицирующего раствора. Испражнения берут стерильным шпателем и вносят в стерильную пробирку с пробкой, содержащую консервант (глицериновая смесь, фосфатно-буферная смесь и Др.).

Мазок из зева







Можно брать материал специальной стеклянной ректальной трубкой, которую вводят в прямую кишку на 8— 15 см. Мочу берут стерильным катетером в стерильную пробирку или банку.

Рвотные массы собирают в стерильную широкогорлую банку, которую закрывают воцаной бумагой, мокроту — в стерильную банку с пробкой или в стерильную чашку Петри.

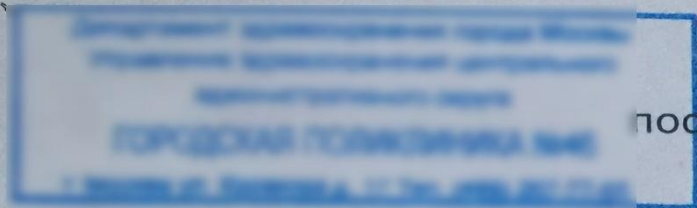
Гнойное отделяемое ран, мазки из зева и носа берут стерильным ватным тампоном на проволоке.

- Кровь из вены для посева берут стерильным шприцем, предварительно обработав локтевой сгиб 75% спиртом, и у постели больного засевают в количестве 5— 10 мл во флакон с жидкой питательной средой в соотношении 1 : 10 (10 мл крови в 100 мл питательной среды).
Трупный материал для микробиологического исследования необходимо брать в первые часы после смерти, так как в дальнейшем микрофлора кишечника распространяется по всему организму.

- Кровь из сердца берут стерильным шприцем. Из селезенки, печени и других органов после предварительного прижигания их поверхности вырезают стерильными ножницами кусочек и помещают в стерильный сосуд.
- При взятии отрезка кишечника или желудка предварительно накладывают две лигатуры выше и ниже места взятия.

- На каждый стеклянный сосуд с инфекционным материалом необходимо наклеить этикетку, где указывают фамилию, имя, отчество больного и дату взятия материала. Надписи делают простым карандашом. К материалу, отправляемому в лабораторию, должно прилагаться направление, в котором указываются:
 - 1) название материала;
 - 2) учреждение, направившее материал;
 - 3) фамилия, имя, отчество больного;
 - 4) его возраст;

- 5) дата взятия материала;
- 6) клинический диагноз;
- 7) цель исследования;
- 8) подпись направляющего врача. Взятый исследуемый материал должен быть доставлен в лабораторию в кратчайший срок.
- Если этот срок удлиняется, материал необходимо сохранять в холодильнике при 4°С или на льду. Материал, содержащий вирусы, должен и при транспортировке находиться в условиях низкой температуры (например, в термосе со льдом).
- Доставку инфицированного материала в лабораторию следует производить с соблюдением мер предосторожности: в закрытой посуде, в специальных металлических биксах, пеналах, чемоданах.



АНАЛИЗ

посев из зева и носа на дифтерию

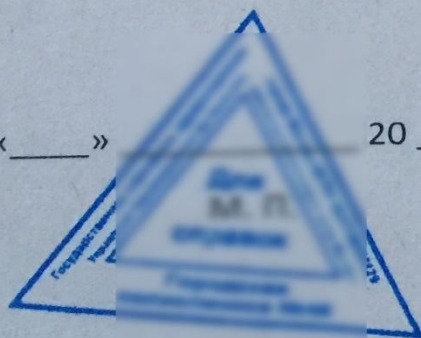
Ф.И.О. _____

Возраст _____ Выдана _____

Заключение и рекомендации _____

Дата « ____ » _____ 20 ____ г.

Врач _____



- Доставка особо опасного материала (от больных холерой, чумой, натуральной оспой и др.) осуществляется в соответствии со специальными инструкциями.
- Исследуемый материал помещают в плотно закрывающиеся сосуды, обвязывают пергаментом или другим водонепроницаемым материалом, после чего их обертывают салфетками, смоченными 5% раствором фенола или лизола (необходима полная гарантия от попадания дезинфицирующего раствора в банки с материалом!).
- После этого сосуды помещают в жестяные коробки с крышкой или металлические биксы. При пересылке на далекие расстояния их помещают в деревянные ящики, опечатывают сургучной печатью и делают надпись: «Опасно. Не открывать во время пересылки». Доставка производится специальным транспортом в сопровождении двух лиц (один из них врач).

- Поступивший в лабораторию материал регистрируют в специальном журнале. Исследуемый материал в лаборатории можно хранить: неконсервированный — при температуре 4°C не более 1—2 сут, консервированный в 50% глицерине, например кусочки органов и тканей, — в течение недель, а при необходимости длительного хранения — при замораживании до —15—20°C.

- Режим работы микробиологической лаборатории зависит от степени опасности работы с тем или иным возбудителем. По степени патогенности и опасности работы все возбудители разделены на группы:
- I — возбудители чумы;
- II — возбудители высококонтагиозных эпидемических заболеваний: бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, сапа, натуральной оспы, различных риккетсиозов и др.;
- III — возбудители эпидемических бактериальных инфекций: кишечных, туберкулеза, дифтерии, патогенные анаэробы, спирохеты (возвратный тиф), простейшие (малярия) и др.;
- IV — все патогенные кокки, гемоглобинофильные бактерии, сальмонеллы.

- Работа с культурами I и II групп инфекций проводится в специальных лабораториях только с разрешения Министерства здравоохранения, III группы — в лабораториях СЭС, IV группы — во всех бактериологических лабораториях. В бактериологической лаборатории существуют специальные формы регистрации и учета исследуемого материала, выделенных культур, их уничтожения, передачи культур патогенных микробов внутри лаборатории и вне ее.

- Обязательным является ведение следующих журналов:
- 1) форма 1—журнал регистрации материалов (культур), поступающих для исследования;
- 2) форма 2—журнал выделенных культур и их уничтожения
- 3) форма 3 — журнал (для лабораторий, работающих с возбудителями I и II групп) движения микробных культур и материалов, подозрительных на зараженность.

- Методы микроскопического исследования микроорганизмов используют при изучении формы и структуры клетки, определении подвижности микробов, изучении включений микробной клетки.
- Микроскоп — сложный прибор, оптическая часть которого смонтирована на специальном штативе. Штатив состоит из основания и отходящей от него колонки, к которой подвижно прикреплены тубус и столик микроскопа. С колонкой связаны две винтовые системы: макрометрический винт, позволяющий быстро передвигать тубус, и микрометрический винт для детальной, более точной установки его.

- Внизу тубуса расположен объектив—увеличивающая оптическая система, которая дает действительное изображение рассматриваемого объекта. На объективах имеется обозначение силы увеличения: 10X, 40X, 90X.
- Даваемое объективом изображение увеличивается при помощи второй системы увеличительных стекол, составляющих окуляр. Он находится в верхнем конце тубуса и увеличивает действительное изображение в 8—15 раз.

- В большинстве микроскопов свет отражается от регулируемого зеркала, расположенного у основания микроскопа. Пройдя через линзу конденсора, свет фокусируется на объекте. В современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света .

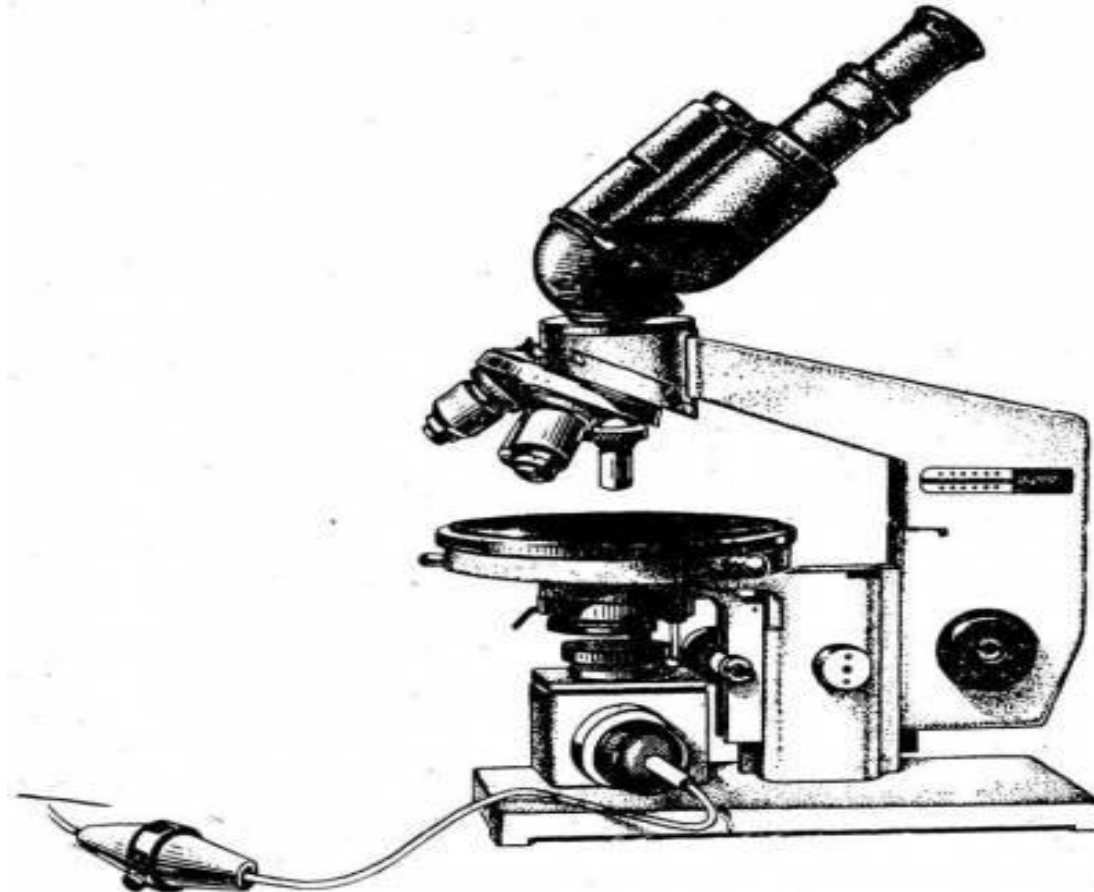


Рис. 18. Биологический микроскоп «Биолам ЛОМО».

- Для увеличения разрешающей силы микроскопа, т. е. уменьшения предела разрешения, используют свет с меньшей длиной волны, например ультрафиолетовый с длиной волны 200— 300 нм (люминесцентная микроскопия).

-

- Способы приготовления препаратов для микроскопии. При помощи светового микроскопа можно изучать микроорганизмы, как в живом, так и в окрашенном состоянии. При исследовании микробов в живом состоянии можно получить представление о размерах, форме и характере их движения. Иногда внутри живой клетки видны блестящие, сильно преломляющие свет гранулы и споры. Для изучения микробов в живом состоянии готовят препараты висячей и раздавленной капли.

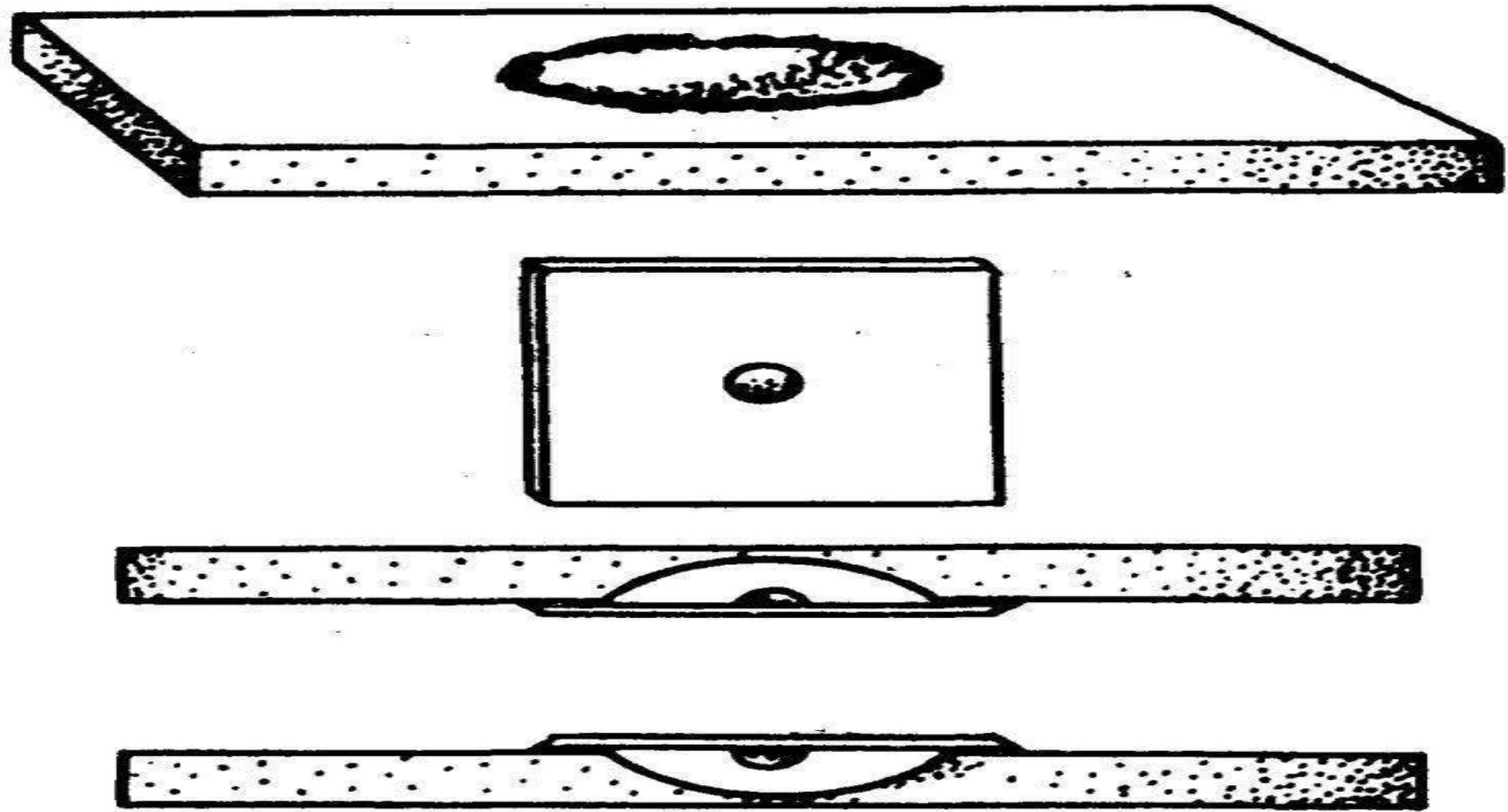
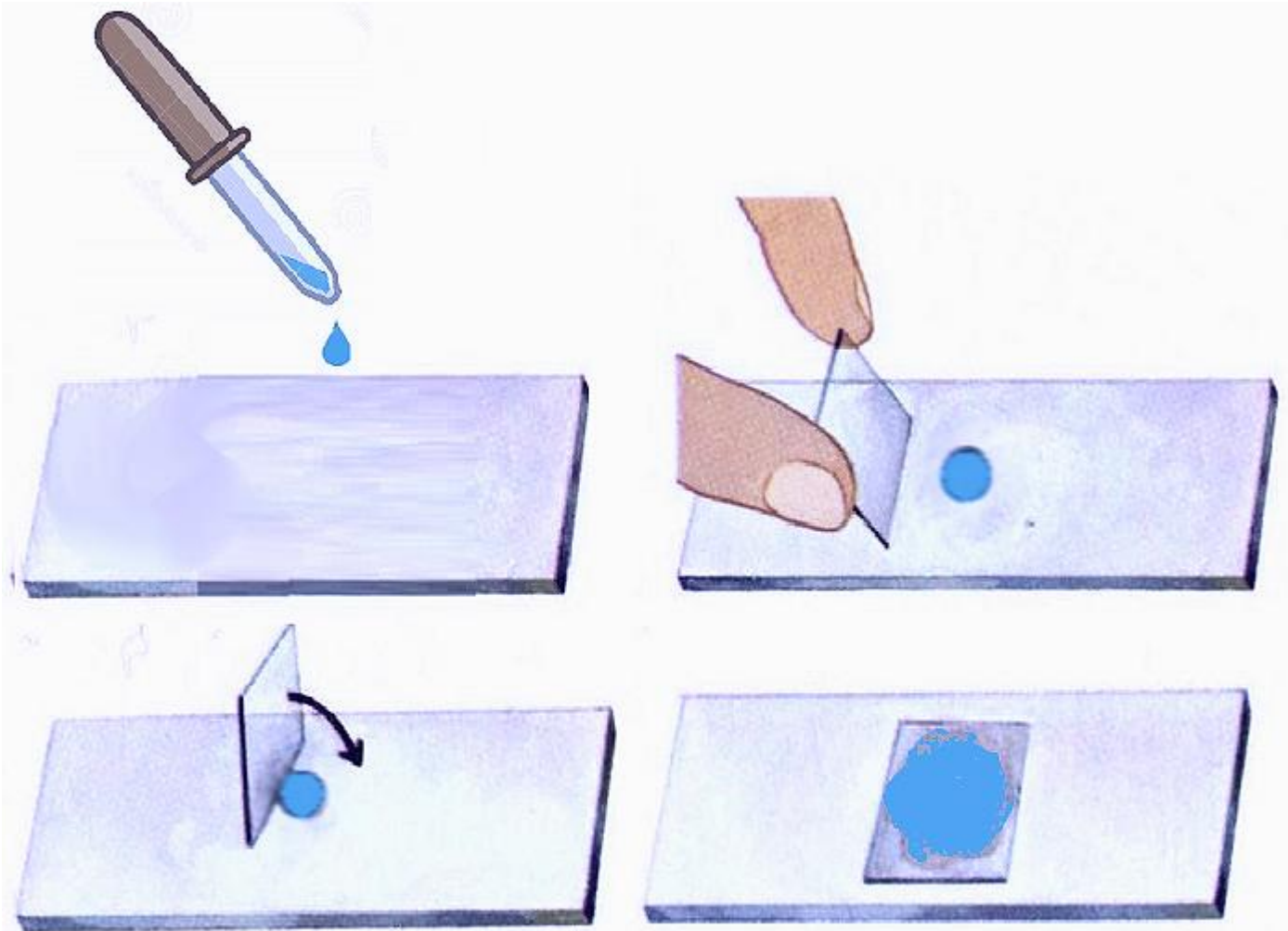


Рис. 19. Камера с висячей каплей.

- . Для приготовления препарата висячей капли (рис. 19) бактериологической петлей в центр покровного стекла наносят небольшую каплю исследуемого материала, суспендированного в жидкости (изотонический раствор хлорида натрия, мясопептонный бульон). Затем берут специальное стекло с луночкой в центре и края ее смазывают вазелиновым маслом. Луночкой предметного стекла накрывают каплю исследуемого материала на покровном стекле так, чтобы капля находилась в центре луночки. Слегка прижимают предметное стекло и быстро переворачивают. При правильном приготовлении препарата капля свисает в луночку. Вазелиновое масло предохраняет ее от высыхания.

- Препарат раздавленной капли готовят нанесением капли суспендированного в жидкости материала на предметное стекло, которое затем накрывают покровным.



Для изучения морфологии микроорганизмов, деталей их структуры используют метод окраски их анилиновыми красителями. Исследуемый материал разводят изотоническим раствором хлорида натрия

или бульоном, маленькую каплю размазывают тонким слоем на предметном стекле по площади диаметром 1 см

и высушивают. Такой препарат называется мазком. Его фиксируют на пламени горелки, если исследуют бактерии, или этиловым либо метиловым спиртом при микроскопии простейших, риккетсий, спирохет.

- Для окрашивания бактерий чаще используют основные красители: метиловый синий, кристаллический фиолетовый, основной фуксин, тионин.
- Широко используют щелочной раствор метиленового синего — краситель Леффлера, позволяющий выявить многие детали формы и структуры микробов.

Люминесцентный микроскоп

- ✓ оснащен двумя светофильтрами
- ✓ используется в фармацевтической промышленности, ветеринарии, растениеводстве, биотехнологии



Револьверная
головка

Объективы

Конденсор под
предметным
столиком

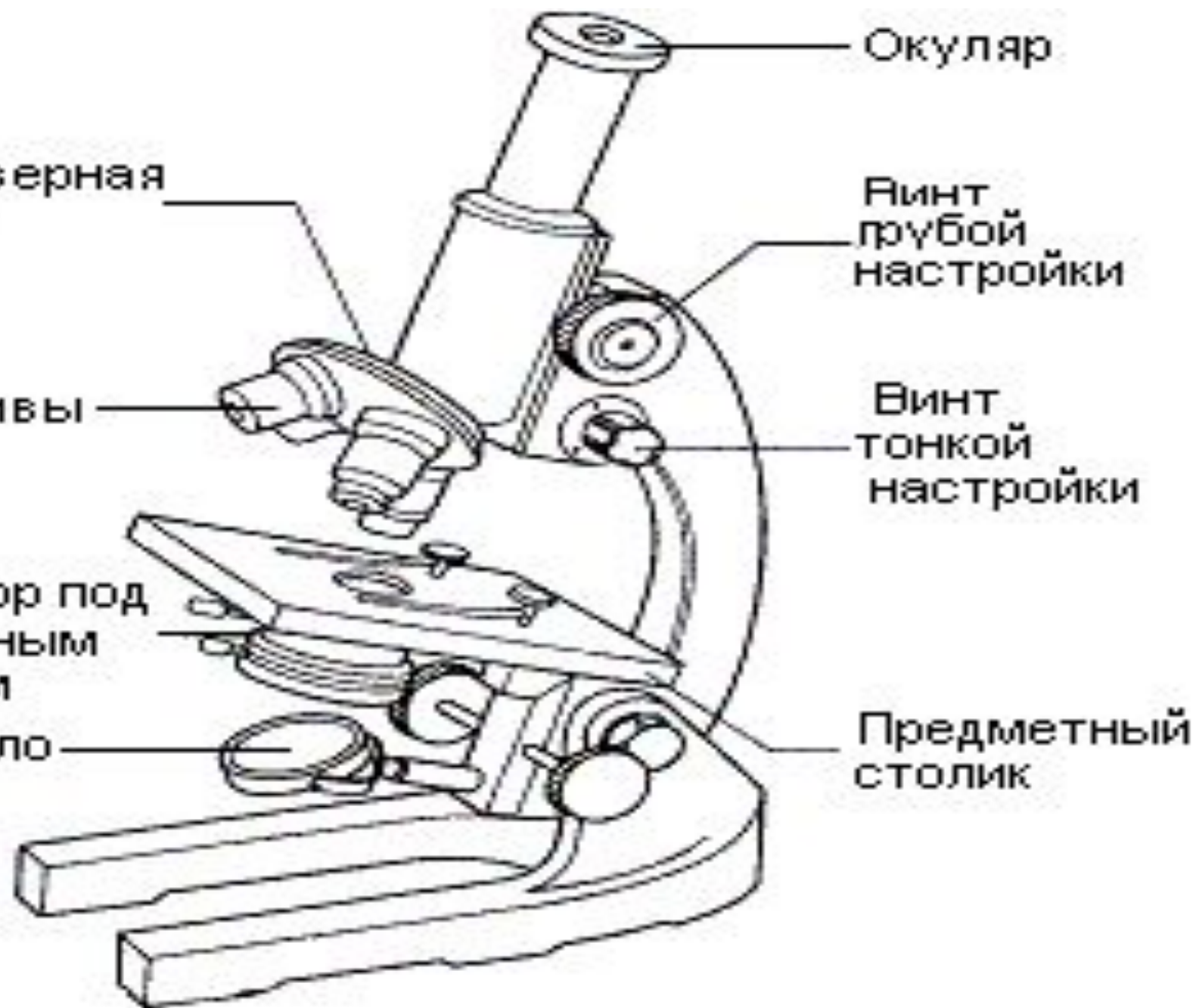
Зеркало

Окуляр

Винт
грубой
настройки

Винт
тонкой
настройки

Предметный
столик

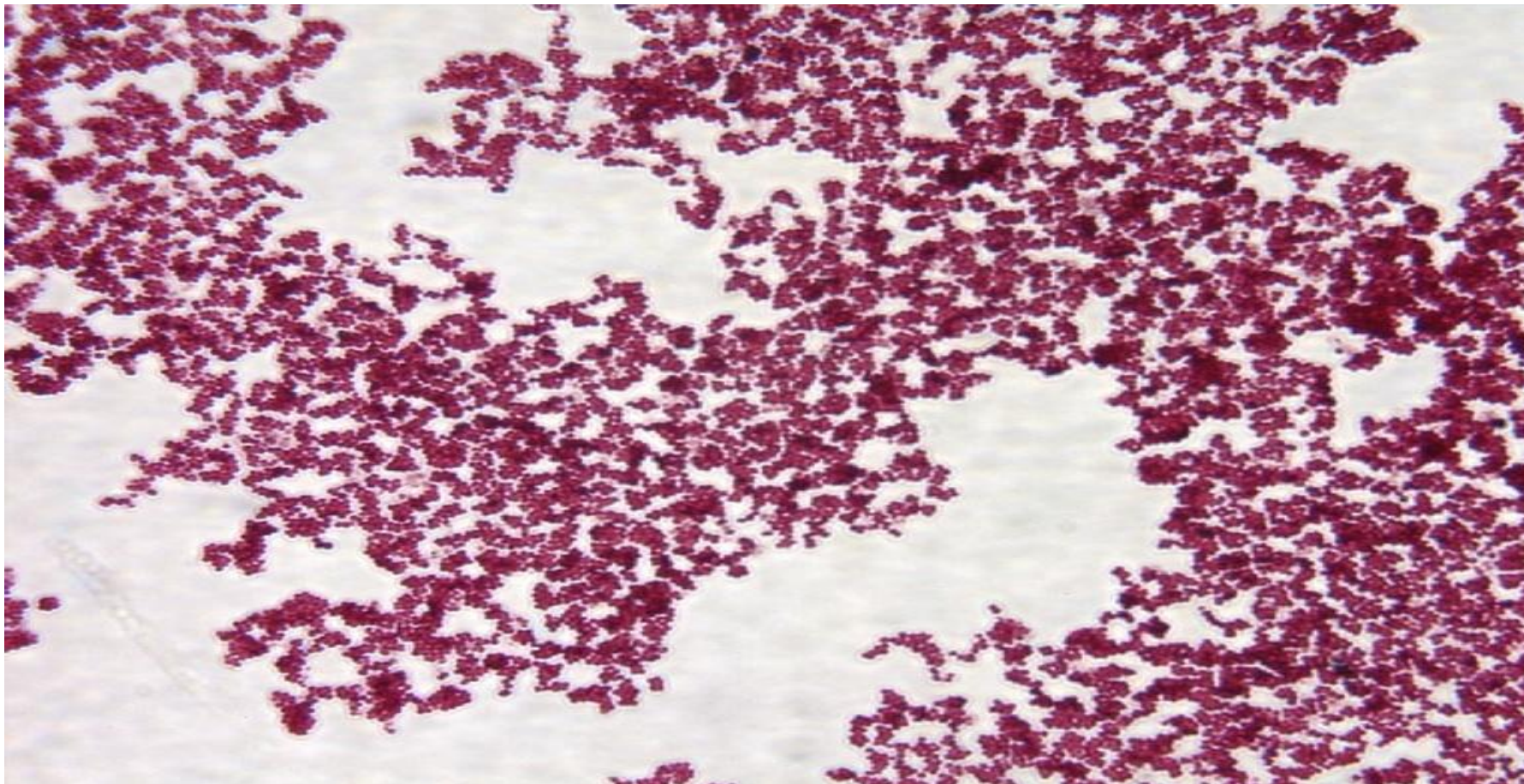


- Однако для выявления спор, капсул, жгутиков, различных структур и органелл, а также сходных по форме бактерий использование для окрашивания только одного красителя (простой способ окраски) бывает недостаточно. Поэтому существуют сложные, специальные методы окрашивания, удовлетворяющие различным требованиям.

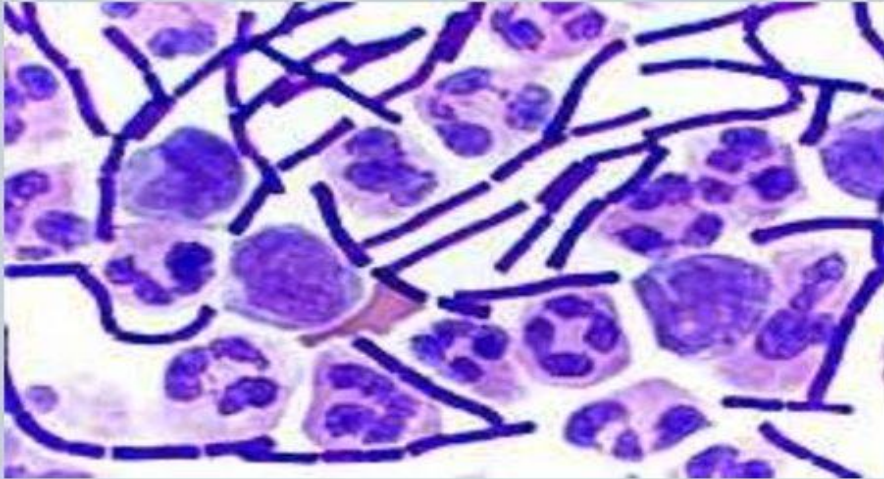
- Способ окраски по Граму позволяет дифференцировать сходные по форме и размерам бактерии, относящиеся к разным видам и родам. Мазок, приготовленный из исследуемого материала, окрашивают вначале кристаллическим фиолетовым в течение 1—2 мин, а затем раствором Люголя 1—2 мин. Все микроорганизмы, находящиеся в мазке, приобретают темно-фиолетовый цвет.
- После этого мазок обрабатывают 96 % этиловым спиртом в течение 30 с— 1 мин, смывая остатки спирта водой. Под влиянием спирта одни бактерии обесцвечиваются, а другие сохраняют фиолетовую окраску, приданную им комплексом красителя с йодом. Те виды микробов, которые сохраняют фиолетовую окраску, называют грамположительными, а обесцвечивающиеся — грамотрицательными. После дополнительной окраски фуксином последние окрашиваются в красный цвет.

- Необходимо помнить, что на результаты окраски по Граму часто влияют небольшие отклонения в условиях культивирования или в методике окраски. Старые культуры или отмирающие клетки грамположительных бактерий могут стать грамотрицательными. В кислой среде, как правило, все микробы грамотрицательны.
- По отношению к окраске по способу Грама все бактерии делятся на две группы: грамположительные (стафилококки, стрептококки, пневмококки, возбудители сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены и др.) и грамотрицательные (менингококки, гонококки, возбудители брюшного тифа, дизентерии и др.).

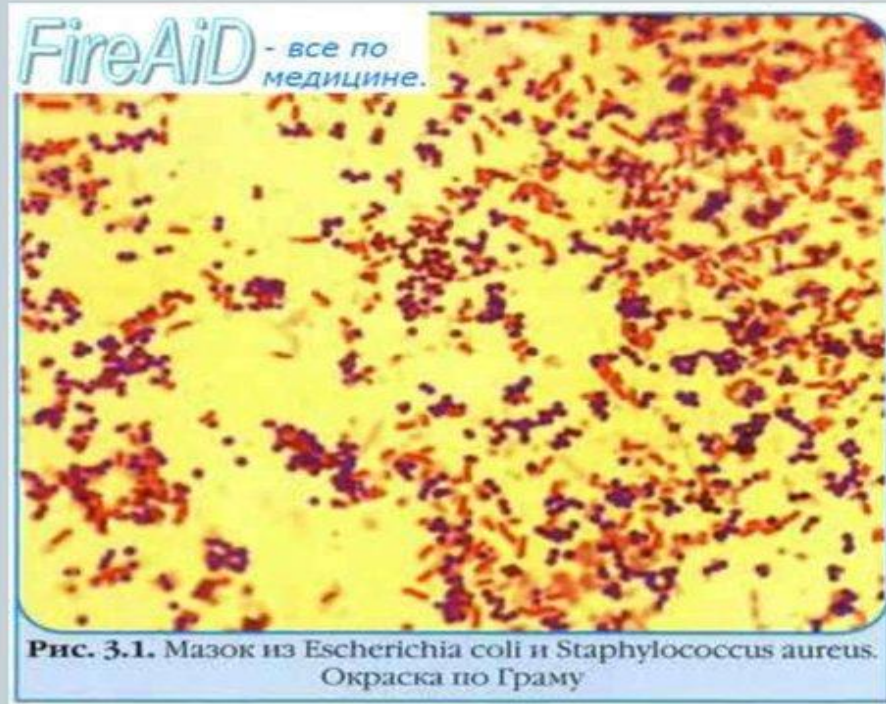
стафилакокк



Окраска по Граму



Грам – положительные бактерии



Окраска по Граму

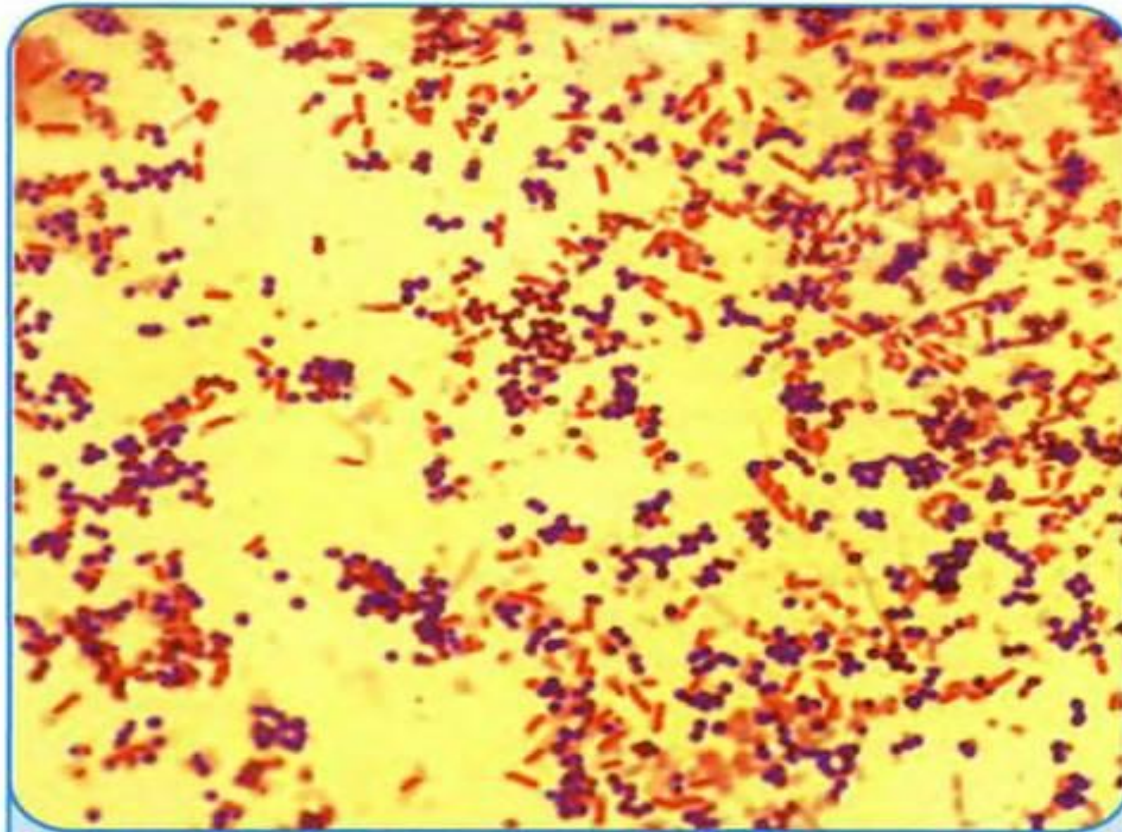
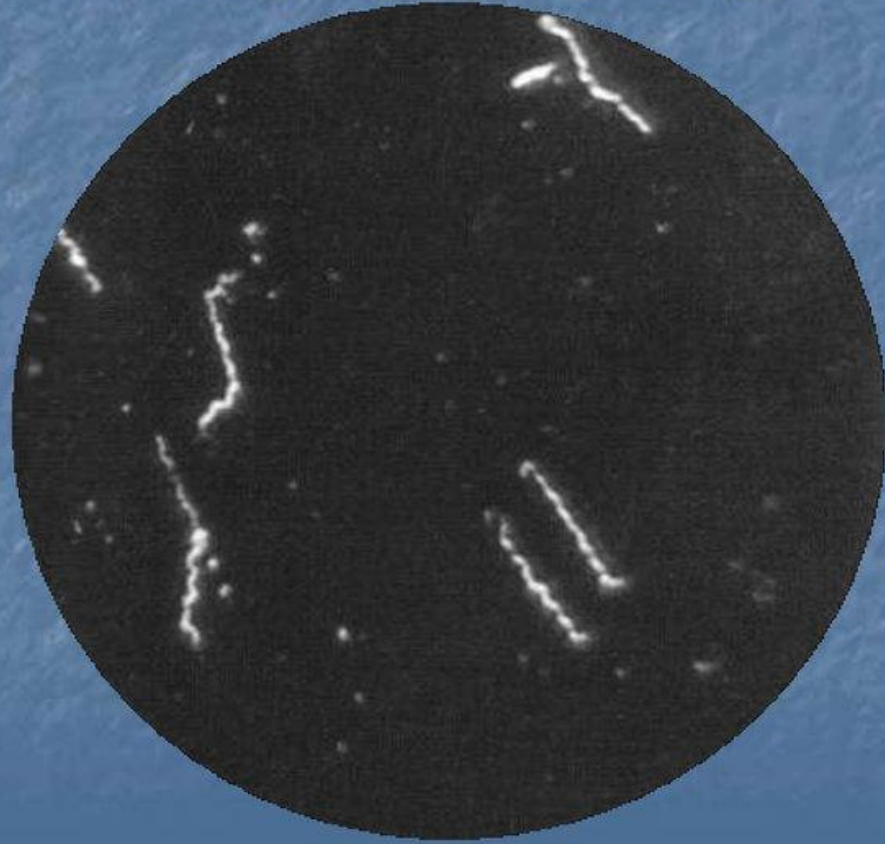


Рис. 3.1. Мазок из *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.
Окраска по Граму

- Исследование микроорганизмов в темном поле (темнопольная микроскопия) основано на явлениях рассеяния света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости частиц. Микроскопия в темном поле зрения позволяет увидеть более мелкие частицы, чем в световом микроскопе. Она осуществляется с помощью обычного светового микроскопа, снабженного специальными конденсорами (параболоид- или кардиоид-конденсор), который создает полый конус света.

ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ



- Поэтому на темном фоне препарата наблюдаются ярко светящиеся контуры микробных клеток и других частиц. Микроскопия в .темном поле зрения позволяет определить форму микроба и его подвижность. Обычно темнопольную микроскопию используют при исследовании микроорганизмов, которые слабо поглощают свет и не видны в световом микроскопе, как, например, спиросхеты.

- Метод фазово-контрастной микроскопии основан на том, что живые клетки и микроорганизмы, слабо поглощающие свет, тем не менее способны изменять фазу проходящих через них лучей (фазовые объекты). В разных участках клеток, отличающихся показателем преломления и толщиной, изменение фаз будет неодинаковым. Эти разности фаз, возникающие при прохождении видимого света через живые объекты, можно сделать видимыми с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Фазово-контрастная микроскопия



- При микроскопии неокрашенных микроорганизмов, отличающихся от окружающей среды только по показателю преломления



- Люминесцентный метод микроскопии занимает важное место в исследовании микроорганизмов. Люминесценцией (или флюоресценцией) называют излучение клеткой света за счет поглощенной энергии. Только немногие бактерии (люминесцирующие) способны светиться собственным светом в результате интенсивных процессов окисления, протекающих у них со значительным выделением энергии.
- Большинство микроорганизмов приобретает способность люминесцировать, или флюоресцировать, при освещении их ультрафиолетовыми лучами после предварительной окраски специальными красителями — флюорохромами.

SHIGELLA FLEXNERI - Дизентерия

Люминесцентная микроскопия

- основана на явлении фотолюминесценции. Люминесценция – свечение веществ, возникающее под воздействием внешнего излучения (ультрафиолетового).

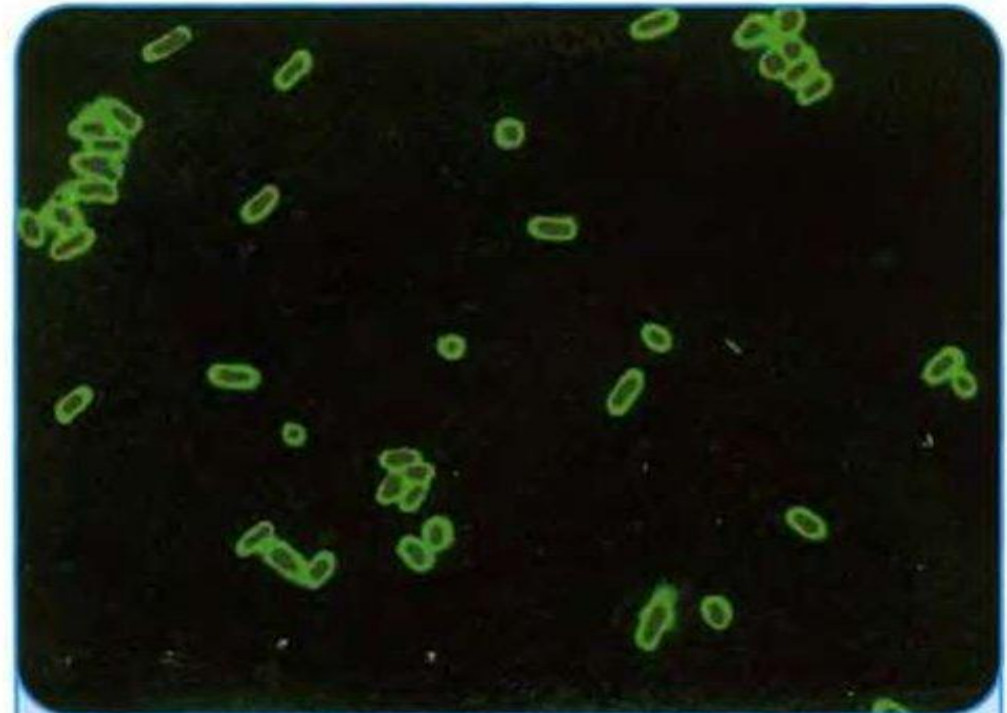


Рис. 3.52. Мазок из чистой культуры *S. flexneri*. РИФ

- Возможности светового микроскопа ограничены не качеством линз, а слишком большой длиной волны видимого света (в среднем 0,55 мкм). Поэтому частицы, диаметр которых меньше этой величины, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Для исследования таких мелких частиц используют электронный микроскоп

-

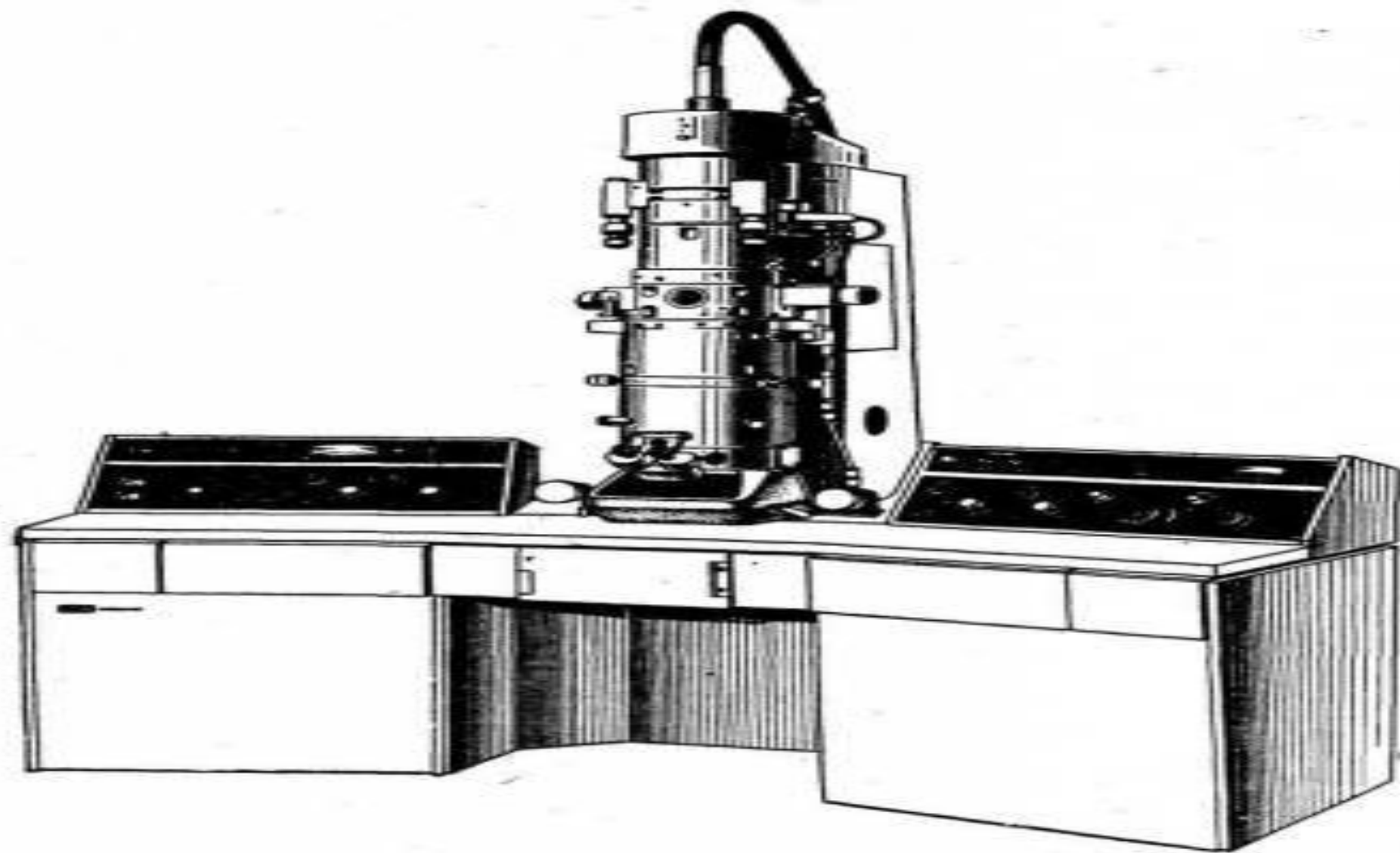


Рис. 20. Электронный микроскоп «JEM-100B».

www.foto-foto.ru

Электронная микроскопия — это способ исследования различных структур, которые не находятся в пределах видимости светового микроскопа и имеют размеры меньше одного микрона

