ВЫСШЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

А. А. ВОРОБЬЕВ, Ю. С. КРИВОШЕИН, В. П. ШИРОБОКОВ

МЕДИЦИНСКАЯ И САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Рекомендовано
Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия по микробиологии, вирусологии, иммунологии для студентов медицинских вузов

4-е издание, стереотипное

ACADEMIA

Москва
Издательский центр «Академия»
2010

УДК 579.61/.63
ББК 52.64я73
В751

Рецензенты:
д-р мед. наук, профессор кафедры эпидемиологии ММА им. И. М. Сеченова
Н. И. Брико;
д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии МГМСУ им. Н. А. Семашко
В. Н. Царёв

Воробьев А. А.

В751 Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков. — 4-е изд., стер. — М. : Издательский центр «Академия», 2010. — 464 с., [16] л. цв. вкл.
ISBN 978-5-7695-6565-6

Изложены современные методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций, а также заболеваний, вызываемых вирусами, грибами, простейшими и гельминтами, распространенных в нашей стране и за рубежом. Приведены методы антимикробных воздействий и санитарно-микробиологического обследования объектов, актуальных в плане возникновения и распространения инфекций.

Дана характеристика общепринятых и новейших микроскопических, культуральных, серологических, аллергологических, биологических и других методов исследования, анализируется их применение при диагностике инфекций.

Для студентов высших медицинских учебных заведений.

УДК 579.61/.63
ББК 52.64я73

© Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Широбоков В. П., 2003
© Широбоков В. П., Петрова Л. И. (наследница Воробьева А. А.), Кривошеина Г. Н. (наследница Кривошеина Ю. С.), 2008
© Образовательно-издательский центр «Академия», 2008
© Оформление. Издательский центр «Академия», 2008

ISBN 978-5-7695-6565-6

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ — антиген
АТ — антитело (иммуноглобулин)
БГКП — бактерии группы кишечной палочки
ВБИ — внутрибольничные инфекции
Гр– — грамотрицательные
Гр+ — грамположительные
ИФ — иммунофлюоресценция
ИФА — иммуноферментный анализ
ИХН — изотонический раствор хлорида натрия
ИЭМ — иммунная электронная микроскопия
КОЕ — колониеобразующие единицы
ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение
МИК — минимальная ингибирующая концентрация
МПА — мясо-пептонный агар
МПБ — мясо-пептонный бульон
НК — нуклеиновые кислоты
ОМЧ — общее микробное число
ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции
ПАВ — поверхностно-активные вещества
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РА — реакция агглютинации
РБТ — реакция бласттрансформации лимфоцитов
РВИЭФ — реакция встречного иммуноэлектрофореза
РГА — реакция гемагглютинации
РГадс — реакция гемадсорбции
РГадсТО — реакция гемадсорбции на твердой основе
РИА — радиоиммуноанализ
РИФ — реакция иммунофлюоресценции
РИЭФ — реакция иммуноэлектрофореза
РН — реакция нейтрализации
РНГА — реакция непрямой гемагглютинации
РОНГА — реакция обратной непрямой гемагглютинации
РП — реакция преципитации
РПГ — реакция преципитации в геле

РПНГ — реакция повреждения нейтрофильных гранулоцитов
РРГ — реакция радиального гемолиза
РСК — реакция связывания комплемента
РТГадс — реакция торможения гемадсорбции
РТМЛ — реакция торможения миграции лейкоцитов
РТНГА — реакция торможения непрямой гемагглютинации
РТОНГА — реакция торможения обратной непрямой гемагглютинации
СПМ — санитарно-показательные микроорганизмы
УПМ — условно-патогенные микроорганизмы
ХАО — хорион-аллантоисная оболочка куриного эмбриона
ЦПД — цитопатическое действие вируса
ЭМ — электронная микроскопия

ОТ АВТОРОВ

Микробиология — интегральная дисциплина, объединяющая ряд самостоятельных предметов, тесно связанных между собой, — бактериологию, вирусологию, микологию, протозоологию и иммунологию, поэтому их изучение рационально проводить комплексно (в едином алгоритме).

Знание лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний, встречающихся у нас в стране и за рубежом, необходимо врачу любой специальности для осуществления правильных и своевременных лечебных и профилактических мероприятий.

В вышедших за последние годы учебниках и учебных пособиях по инфекционной патологии для студентов медицинских вузов основное внимание уделяется вопросам этиологии, патогенеза, профилактики и лечения, тогда как лабораторная диагностика представлена кратко, схематично, недостаточно отражены экспресс-методы исследования.

В данном пособии детально представлены этапы лабораторной диагностики бактериальных, вирусных инфекций, протозоозов, микозов и гельминтозов, а также методы санитарно-микробиологических исследований различных объектов внешней среды. Описаны современные методы исследования, основанные: на морфологических признаках возбудителя, его культуральных и других физиологических свойствах; особенностях взаимодействия с организмом экспериментальных животных в модельных опытах; антигенном строении возбудителя и реакциях макроорганизма на эти антигены (идентификация микроорганизмов или индикация их антигенов, серологическая и аллергологическая диагностика инфекционного заболевания); определении генома возбудителя в исследуемом материале или геноидентификации.

Большое внимание уделено экспресс-диагностике инфекционных болезней и новейшим методам иммуно- и генодиагностики, которые начинают широко применяться в лабораторной практике. Среди них иммуноферментный анализ, иммуноэлектронная микроскопия, реакция иммунофлюоресценции, радиоиммуноло-

гический метод, реакция обратной непрямой гемагглютинации, иммуноферритиновая, иммуноблотинг, гибридизация и секвенирование нуклеиновых кислот и др.

Все названия микроорганизмов приведены в соответствии с 9-м изданием «Определителя бактерий» Берджи и более поздними изменениями официальной номенклатуры микроорганизмов.

Большую помощь в подготовке рукописи к изданию оказали ведущие преподаватели кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии, инфекционных болезней медицинских вузов Москвы, Симферополя, Киева, Рязани: Ю. Н. Ачкасова, М. А. Борисова, Е. В. Буданова, А. Г. Букринская, А. С. Быков, В. Г. Войцеховский, Н. В. Давыдова, В. Я. Кицак, О. Н. Корнюшенко, Ю. Л. Криворутченко, К. И. Липатникова, А. Ю. Миронов, Ю. В. Несвижский, Д. Н. Нечаев, Е. П. Пашков, К. Д. Пяткин, А. М. Рыбакова, О. В. Салата, Т. А. Сарачан, И. В. Смирнов, Т. Н. Тарасов, Л. В. Тышкевич, Г. Н. Усатова, А. А. Фурман, А. Б. Хайтович, М. В. Шилов, А. И. Якименко.

Мы понимаем, что книга не лишена недостатков, и будем благодарны и признательны читателям за критические замечания, отзывы и пожелания, высказанные в наш адрес.

Академик РАМН и РАМТН, профессор А. А. Воробьёв
Академик РАМТН, профессор Ю. С. Кривошеин
Академик РАМТН и НАНУ, профессор В. П. Широбоков

РАЗДЕЛ I
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЛАВА 1
МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Для микробиологической диагностики бактериальных инфекций используют различные методы:

бактериоскопические, основанные на изучении морфологических признаков возбудителя; они направлены на обнаружение микроорганизмов в нативных или окрашенных препаратах;

бактериологические, основанные на изучении культуральных и других физиологических свойств возбудителя; они предполагают культивирование, выделение чистых культур, идентификацию и типирования возбудителей;

биологические, основанные на изучении особенностей взаимодействия микроба с организмом экспериментальными животными в модельных опытах;

серологические, основанные на изучении антигенных свойств возбудителя и реакций макроорганизма на эти антигены (серологическая и аллергологическая диагностика инфекционного заболевания; антигенная идентификация микроорганизмов или их компонентов);

молекулярно-генетические — обнаружение фрагментов генома возбудителя в биологическом материале при помощи молекулярной гибридизации ДНК или РНК, а также ПЦР.

При инфекционном заболевании часто один из этих методов является основным, а другие — вспомогательными. Материалом для проведения микробиологической диагностики могут быть кровь, кал, моча, желчь, кусочки пораженных тканей и др. Далее будут приведены основные микробиологические методы лабораторной диагностики бактериальной инфекции.

1.1. Бактериоскопическое исследование

1.1.1. Методы микроскопического исследования

Метод бактериоскопического исследования приобретает особое значение, если микроб имеет морфологические и тинкториальные особенности или особую локализацию в тканях, клетках

организма. Только при некоторых инфекциях для постановки диагноза достаточно морфологического исследования. Для диагностики большинства инфекций микроскопия, как первый этап микробиологического исследования, имеет лишь вспомогательное, ориентировочное значение. Разрешающая способность метода составляет в среднем 100 000 клеток в 1 мл.

В микробиологических лабораториях применяются не только обычные методы оптической микроскопии в проходящем свете, но и специальные: в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный и электронный.

Световая микроскопия. Световой микроскоп имеет сухой и иммерсионный объективы. Сухой объектив с относительно большим фокусным расстоянием и слабым увеличением обычно применяют для изучения относительно крупных биологических и гистологических объектов. При изучении микроорганизмов используют главным образом иммерсионный («погружной») объектив с небольшим фокусным расстоянием и более высокой разрешающей способностью (увеличение 60×—100×). При иммерсионной микроскопии объектив погружают в масло (кедровое, персиковое, «иммерсиол» и др.), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. В этом случае лучи света, пройдя через предметное стекло, не меняют своего направления и не рассеиваются, а попадают в объектив (рис. 1.1, *а*). Разрешающая способность иммерсионного объектива около 0,2 мкм. Максимальное увеличение современных оптических микроскопов достигает 2000×—3000×.

Микроскопия в темном поле зрения. Этот вариант микроскопии проводится с использованием специального приспособления темного поля (микроскоп с таким устройством еще называют ультрамикроскопом). При боковом освещении в темном поле зрения наблюдают живые объекты величиной 0,02—0,06 мкм. Чтобы получить яркое боковое освещение, обычный конденсор заменяют на параболоид-конденсор, в котором центральная часть линз непрозрачна, а боковая поверхность конденсора зеркальная. Такой конденсор задерживает центральные лучи, образуя темное поле

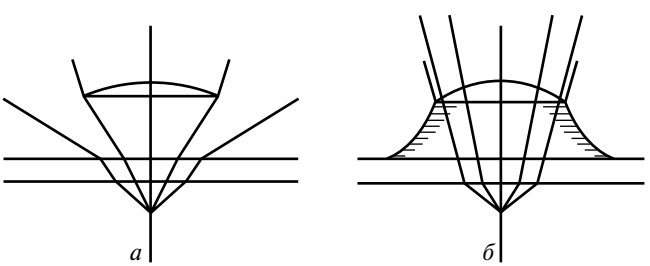

Рис. 1.1. Ход лучей в сухой (*а*) и иммерсионной (*б*) системах

зрения. Краевые лучи проходят через кольцевую щель, попадают на боковую зеркальную поверхность конденсора, отражаются от нее и концентрируются в фокусе. Встречая на своем пути клетки микроорганизмов или другие оптически плотные частицы, луч света отражается от них и попадает в объектив. Клетки микроорганизмов и другие объекты в этом случае ярко светятся на темном фоне.

Источником искусственного света служит электрический осветитель. Для бокового освещения необходим параллельный пучок света, который получают с помощью плоского зеркала микроскопа.

При микроскопии материала в темном поле зрения обычно используют объектив сухой системы (40×). Небольшую каплю изучаемого материала помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, не допуская образования пузырьков воздуха. На верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла, которое должно заполнить пространство между конденсором и предметным стеклом.

Темнопольная микроскопия применяется для обнаружения в неокрашенных (нативных) препаратах возбудителей сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза и других болезней, а также для изучения подвижности микроорганизмов. Однако исследование в темном поле зрения не позволяет хорошо изучить их форму и тем более внутреннее строение. Для этой цели используют специальные методы световой микроскопии.

Фазово-контрастная микроскопия. Известно, что оптическая длина пути света в любом веществе зависит от показателя преломления. Световые волны, проходящие через оптически более плотные участки объекта, отстают по фазе от волн, не проходящих через эти участки. При этом интенсивность света не меняется, а изменяется только фаза колебания, не улавливаемая глазом и фотопластинкой. Для повышения контрастности изображения в объектив микроскопа вкладывают специальную полупрозрачную фазовую пластинку, в результате чего между лучами фона и объекта возникает разность амплитуд световых волн. Если она достигает ¼ длины волны, то возникает заметный для глаза эффект, когда темный объект отчетливо виден на светлом фоне (положительный контраст), или наоборот (отрицательный контраст), в зависимости от структуры фазовой пластинки.

Фазово-контрастная микроскопия не увеличивает разрешающей способности оптической системы, но помогает выявить новые детали структуры живых микроорганизмов, изучить различные стадии их развития, влияние на них химических веществ, антибиотиков и других факторов.

Люминесцентная микроскопия. Люминесценция (или флюоресценция) — это способность некоторых объектов и красителей при

попадании на них ультрафиолетовых или других коротковолновых лучей света испускать лучи видимой части спектра (зеленые, желтые, оранжевые).

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценцию. При первичной флюоресценции исследуемый объект содержит вещества (витамины, пигменты и другие продукты обмена), способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Бóльшая часть объектов микроскопии не обладает собственной флюоресценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии их обрабатывают красителями (флюорохромами), способными флюоресцировать. В качестве флюорохромов используют аурамин (для микобактерий туберкулеза), акридиновый желтый (для гонококков), корифосфин (для коринебактерий дифтерии), флюоресцеинизотиоцианат, или ФИТЦ (для изготовления меченых антисывороток) и др.

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют 5—10 мин в ацетоне или этаноле и наносят на него флюорохром на 20—30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15—20 мин, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Люминесцентные микроскопы представляют собой обычные биологические микроскопы, снабженные ярким источником света (как правило, ртутно-кварцевые лампы, излучающие ультрафиолет и сине-фиолетовые лучи, возбуждающие люминесценцию) и набором светофильтров, предназначенных для выделения из общего светового потока строго определенных участков спектра. Флюорохромы, связываясь с НК или белками, образуют стойкие комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветами.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычными методами микроскопии следующие: цветное изображение; значительная контрастность; возможность исследования как живых, так и погибших микроорганизмов, прозрачных и непрозрачных объектов, обнаружение отдельных бактерий, вирусов и их АГ, установление их локализации; дифференцирование отдельных компонентов клетки.

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе вместо света используется поток электронов в безвоздушной среде, на пути которых находится анод. Источником электронов является электронная пушка (вольфрамовая проволока, разогреваемая до 2500—2900 °С). Роль оптических линз играют электромагниты. Между вольфрамовой нитью и анодом создается электрическое поле с напряжением 30 000—50 000 В, что сообщает электронам большую скорость, и они, проходя через отверстие анода, попадают в первую электромагнитную линзу (конденсор). Электронные лучи при выходе из конденсора собираются в плоскости исследуемого

объекта, отклоняются под разными углами за счет различной толщины и плотности препарата и попадают в электромагнитную линзу объектива, снабженного диафрагмой. Электроны, мало отклонившиеся при встрече с объектом, проходят через диафрагму, а отклонившиеся под большим углом задерживаются, благодаря чему обеспечивается контрастность изображения. Линза объектива дает промежуточное увеличенное изображение, которое рассматривают через смотровое окно. Проекционная линза позволяет увеличивать изображение во много раз. Это изображение попадает на флюоресцирующий экран и может фотографироваться. Новейшие электронные микроскопы дают возможность видеть частицы величиной 0,2—2,0 нм (в зависимости от типа объекта).

Электронную микроскопию широко используют в микробиологии для детального изучения строения микроорганизмов, а в вирусологии также и с диагностической целью (см. подразд. 3.1.4).

Для исследования препаратов в электронном микроскопе вместо предметных стекол применяются специальные пленки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служат коллодий, окись алюминия и кварц. Тщательно очищенный от различных примесей и нанесенный на пленку исследуемый материал после испарения жидкости оставляет на ней тончайший слой, который и подлежит микроскопии. В электронном микроскопе можно также исследовать срезы тканей, клеток, микроорганизмов, полученные с помощью ультрамикротома. Препараты контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ, используя разные методы: напыление тяжелых металлов, обработка фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом, солями осмиевой кислоты и др.

1.1.2. Приготовление и окраска препаратов-мазков для световой микроскопии

Приготовление мазков, их окраску и другие микробиологические манипуляции осуществляют на заранее подготовленном рабочем месте. На столе должны находиться только материалы и предметы, необходимые для данного исследования, а именно: изучаемый объект (кровь, гной, мокрота, кал и др.), пробирки или чашки с культурой микроорганизмов, стерильная водопроводная вода или ИХН, штатив для бактериологической петли, банки с чистыми обезжиренными предметными стеклами и карандашами по стеклу. Помимо этого, необходимы газовая горелка или спиртовка, растворы красителей, ванночка с подставкой (мостик) для стекол, промыватель с водой, пинцет, фильтровальная бумага, банка с дезинфицирующим раствором, используемым для обезвреживания отработанных препаратов и пипеток.

Методы обработки стекол. Новые стекла кипятят в 1%-м растворе гидрокарбоната натрия, промывают водой, помещают в слабый раствор соляной кислоты, после чего снова промывают водой. Стекла, бывшие в употреблении, помещают в концентрированную (техническую) серную кислоту на 2 ч или в смесь серной кислоты, бихромата калия и воды (100 : 50 : 1000), тщательно промывают водой, кипятят в растворе гидрокарбоната или гидроксида натрия, затем снова промывают водой, вытирают обезжиренной льняной ветошью и хранят в спирте или в смеси спирта с эфиром в банках с притертыми пробками. Для мытья стекол применяют также стиральные порошки. Для обезжиривания стекла натирают сухим кусочком мыла и протирают чистой марлей. При изготовлении мазков стекла заранее извлекают пинцетом из раствора, в котором они хранились, и насухо вытирают. Держат их пальцами за края. Капля, нанесенная на правильно подготовленное стекло, равномерно растекается и не принимает шаровидную форму.

Приготовление препарата-мазка. Перед приготовлением препарата предметные стекла обжигают в пламени горелки для их дополнительного обезжиривания.

Для приготовления *мазка из культуры бактерий*, *выращенной на плотной среде*, на охлажденное стекло наносят каплю ИХН или воды. Пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки. Петлю стерилизуют в пламени горелки. Ватную пробку зажимают мизинцем правой руки, извлекают ее из пробирки и оставляют в таком положении. Края пробирки фламбируют, обжигая их в пламени горелки, а затем в пробирку через пламя вводят петлю. Остудив петлю о внутреннюю стенку пробирки, прикасаются ею к питательной среде на границе стекла (если петля недостаточно охлаждена, то она вызывает треск и расплавляет среду).

Охлажденной петлей прикасаются к культуре микроорганизмов на поверхности среды. Затем петлю извлекают, быстро обжигают края пробирки, закрывают ее пробкой, проведенной через пламя, и ставят пробирку в штатив. Все описанные действия производят только вблизи пламени горелки. Культуру вносят петлей в каплю воды или ИХН на стекле и распределяют равномерно круговыми движениями на площади диаметром 1,0—1,5 см, затем петлю обжигают.

Для приготовления *мазка из культуры бактерий*, *выращенной в жидкой питательной среде*, на середину обезжиренного в пламени горелки предметного стекла наносят каплю культуры петлей или пастеровской пипеткой (затем пипетку погружают в дезинфицирующий раствор) и равномерно распределяют ее петлей. Предварительно с обратной стороны стекла восковым карандашом очерчивают границы препарата, так как очень тонкие мазки

почти незаметны. Со стороны мазка на стекле указывают номер анализа или культуры.

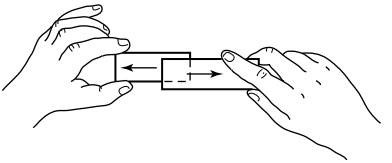

Рис. 1.2. Приготовление мазка из мокроты

Для приготовления *мазка из гноя или мокроты* используют два предметных стекла. Небольшое количество материала переносят стерильной петлей или иглой на середину предметного стекла и покрывают вторым так, чтобы осталась свободной треть первого и второго стекол. Стекла раздвигают в стороны (рис. 1.2) и получают два больших мазка одинаковой толщины.

Мазок из крови готовят следующим образом. Стерильной иглой укалывают предварительно продезинфицированный безымянный палец левой руки. Первую каплю крови удаляют сухой ваткой, а затем прикасаются к выступившей капле крови поверхностью хорошо обезжиренного предметного стекла. Стекло быстро кладут на стол, придерживая его левой рукой, и прикасаются к капле крови на нем краем второго, несколько более узкого шлифованного стекла, установленного под углом 45° (рис. 1.3). Легким быстрым движением, прижимая шлифованное стекло, продвигают его влево по предметному стеклу, не доходя 1,0—1,5 см до края. Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивается.

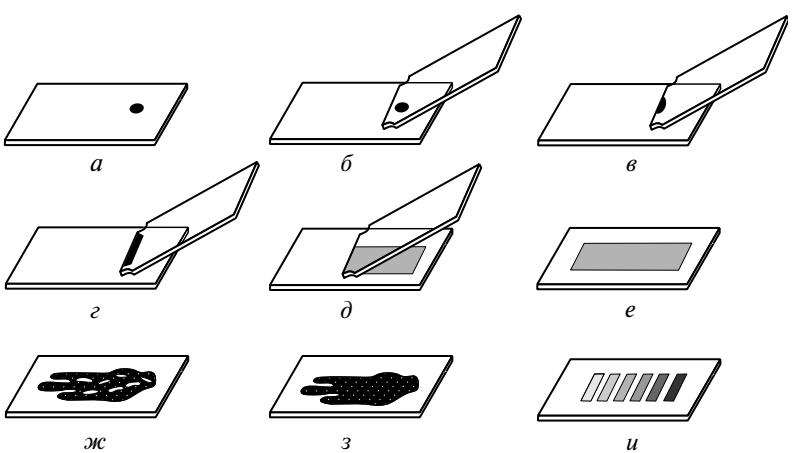

Рис. 1.3. Приготовление мазка из крови:

а—е — этапы приготовления тонкого мазка; *ж—и* — неправильно приготовленные мазки

Препараты-отпечатки делают из внутренних органов трупов, пищевых продуктов плотной консистенции (мясо, ветчина и др.). Поверхность органов или пищевого продукта прижигают раскаленным скальпелем и из этого участка вырезают кусочек материала. Поверхностью разреза прикасаются к стеклу в двух-трех местах.

Высушивание и фиксирование. Тонко приготовленные мазки обычно быстро высыхают на воздухе при комнатной температуре, более толстые высушивают в термостате или при легком подогревании над пламенем горелки или спиртовки. При этом стекло держат за края большим и указательным пальцами мазком вверх, средний палец помещают под стеклом, чтобы регулировать степень нагревания и не допустить свертывания белка бактерий и нарушения структуры клеток.

Высушенные мазки фиксируют в пламени горелки для того, чтобы убить и закрепить бактерии на стекле, предотвратив их смывание в процессе окраски. Убитые микроорганизмы лучше воспринимают красители, а также не представляют опасности для работающих. Предметное стекло берут пинцетом или большим и указательным пальцами правой руки мазком вверх и троекратно проводят через наиболее горячую часть пламени горелки. Фиксация этим способом продолжается около 5—6 с, а действие пламени — 2 с.

Мазки крови, препараты-отпечатки и мазки из культуры бактерий, деформирующиеся при высокой температуре, обрабатывают одним из следующих фиксаторов: метиловым спиртом (в течение 5 мин); этиловым спиртом (10—15 мин); смесью Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира — 10—15 мин); ацетоном (5 мин); парами осмиевой кислоты и формалина (несколько секунд).

Окраска препарата-мазка. Препараты окрашивают анилиновыми красителями. С химической точки зрения различают кислые, основные и нейтральные красители. Основные красители, у которых красящая часть молекулы заряжена положительно, более активно вступают в соединение с отрицательно заряженной бактериальной клеткой.

Окраска бактерий является сложным физико-химическим процессом. При взаимодействии красителя с веществами клетки микроорганизма образуются соли, обеспечивающие прочность окраски. Отношение разных видов микроорганизмов к красителям называют тинкториальным свойством.

Наиболее широко применяются следующие красители: красные (фуксин основной, фуксин кислый, сафранин, нейтральный красный, конго красный); синие (метиленовый синий, толуидиновый синий, трипановый голубой и др.); фиолетовые (генциановый, метиловый или кристаллический); желто-коричневые (везувин, хризоидин).

Все применяемые красители имеют порошкообразный или кристаллический вид. Из таких красителей, как фуксин основной,

генциановый фиолетовый, метиленовый синий, заранее готовят насыщенные спиртовые растворы (1 г красителя на 10 мл 96%-го спирта). Из насыщенных спиртовых и фенольных растворов красителей готовят водно-фенольные или водно-спиртовые растворы, используемые для окраски простыми и сложными методами.

Простые методы окраски позволяют определить наличие бактерий в препарате, их форму, размеры и взаиморасположение клеток. Для окраски этими методами используют, как правило, один краситель, позволяющий отличить частицы от неокрашенного фона.

Для приготовления фенольного фуксина Циля, отличающегося стойкостью при хранении, используют основной фуксин. Бактерии и другие микроорганизмы окрашиваются фуксином Циля в красный цвет.

Фенольный фуксин Циля

Основной фуксин	1 г
Спирт этиловый (95%-й)	10 мл
Фенол кристаллический	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 доливают дистиллированную воду. Краситель выдерживают 48 ч при комнатной температуре и фильтруют. Срок хранения длительный.

Фуксин Пфейффера

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

При окраске фуксином Пфейффера следует использовать свежеприготовленный раствор.

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего

Метиленовый синий	10 г
Спирт этиловый (95%-й)	100 мл

Щелочной раствор метиленового синего по Леффлеру

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего	30 мл
Натрия (калия) гидроксид (1%-й)	1 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Водно-спиртовой раствор метиленового синего

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего	10 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Старые растворы этого красителя обладают лучшей красящей способностью.

Фиксированный препарат помещают мазком вверх на подставку. На всю поверхность мазка пипеткой наносят раствор красителя. Фуксином Пфейффера окрашивают 1—2 мин, щелочным раствором метиленового синего Леффлера или водно-спиртовым раствором метиленового синего — 3 — 5 мин. После окраски краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают между листками фильтровальной бумаги и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива (см. цв. вклейку, рис. 1).

Прижизненная окраска микроорганизмов. Окраску производят метиленовым синим, нейтральным красным и другими малоядовитыми красителями в разведении 1 : 10 000. Для этого на предметном стекле смешивают каплю исследуемого материала с раствором красителя и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом 40×.

Окраска по методу Бури. При негативном способе окраски живых бактерий по этому методу бактерии остаются неокрашенными на темном фоне. В каплю туши, разведенную 1 : 10 дистиллированной водой, вносят исследуемую культуру и равномерно распределяют петлей или краем предметного стекла. Мазок сушат на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой (рис. 1.4). Вместо туши иногда используют нигрозин, конго красный и др.

Сложные методы окраски предполагают использование нескольких красителей и дают возможность дифференцировать одни микробы от других, а также изучать особенности строения микробных клеток. К ним относят окраску по Граму, Цилю—Нильсену, Нейссеру, Романовскому—Гимзе и др.

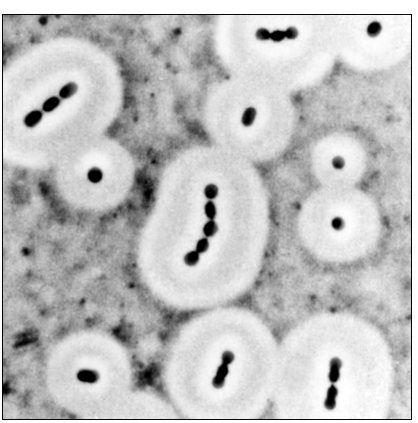

Рис. 1.4. *Streptococcus pneumoniae* в тушевом препарате по Бурри (видна выраженная капсула)

Дифференцирующий метод окраски, предложенный Хансом Христианом Иоахимом Грамом в 1884 г., не утратил практического значения до настоящего времени.

Окраска по методу Грама. При окраске этим методом все бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные, что облегчает проведение дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний и выбор средств антимикробной терапии.

Грамположительные бактерии и дрожжи после окраши-

вания кристаллвиолетом и связывания с иодом не обесцвечиваются в органических растворителях, оставаясь сине-фиолетового цвета; грамотрицательные — обесцвечиваются (возможно, за счет высокого содержания липидов и отсутствия тейхоевых кислот в клеточной стенке), становясь красными после докрашивания сафранином или фуксином (см. цв. вклейку, рис. 2).

Общепринятый метод. Следует подготовить следующие растворы: 1) спиртовой раствор генцианового или кристаллического фиолетового; 2) иодный раствор Люголя; 3) обесцвечивающий раствор (95%-й этиловый спирт и/или ацетон); 4) фуксин Пфейффера или сафранин.

Спиртовой раствор генцианвиолета

Генциан фиолетовый	20 г
Спирт этиловый (95%-й)	200 мл
Вода дистиллированная	800 мл

Генциан фиолетовый, метиловый фиолетовый и кристаллический фиолетовый принадлежат к красителям трифенилметанового ряда, что позволяет применять их в одинаковой степени для окраски по методу Грама. Краситель растворяют, растирая в ступке с добавлением спирта, затем добавляют воду, настаивают в течение 1 сут при комнатной температуре и фильтруют готовый раствор.

Иодный раствор Люголя

Иод кристаллический (I_2)	1 г
Калия иодид	2—5 г
Вода дистиллированная	300 мл

Смешать ингредиенты и оставить на сутки для растворения иода (иногда приходится добавлять кристаллы KI).

Обесцвечивающий раствор

Ацетон	400 мл
Спирт этиловый (95%-й)	1200 мл

Внимание! Отдельные компоненты и смесь огнеопасны. Возможно использование компонентов по отдельности или в других соотношениях. Обесцвечивание ацетоном происходит более быстро.

Раствор сафранина

Сафранин (2,5%-й раствор в 95%-м этиловом спирте)	25 мл
Вода дистиллированная	75 мл

Вначале готовят 2,5%-й спиртовой раствор сафранина, затем смешивают его в указанной пропорции с водой. В нашей стране в качестве второго красителя чаще используют фуксин Пфейффера (см. выше), который лучше прокрашивает, например клетки грамотрицательных анаэробов.

Окраска состоит из четырех этапов.

1. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу, на которую наливают раствор генцианвиолета на 30—60 с (при окраске по методу Синева мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, заранее пропитанной раствором генцианового фиолетового и высушенной, на бумагу наносят 2—3 капли воды и выдерживают 1—2 мин), затем раствор сливают.

2. Обрабатывают мазок раствором Люголя 1 мин и, не промывая его водой, сливают раствор.

3. Обесцвечивают мазок 95%-м спиртом и/или ацетоном, покачивая стекло до исчезновения серо-фиолетовых струек красителя (в течение 20—50 с), и немедленно промывают препарат водой.

4. Наливают на мазок фуксин Пфейффера, через 1—2 мин краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Окраска по Граму позволяет дифференцировать возбудителей инфекционных заболеваний. Так, например, известно, что все болезнетворные кокки, кроме гонококка и менингококка, являются грамположительными; вибрионы, трепонемы, кампилобактеры, хеликобактеры и энтеробактерии — грамотрицательными, все патогенные бациллы и клостридии — грамположительными.

Окрашивание по Граму в модификации Аткинса (*K. N. Atkins*, *1920*). Обычно используют для улучшения окраски грамположительных бактерий, состав красителей несколько отличается.

Спиртовой раствор генцианвиолета

Кристаллический фиолетовый (85—90%-й)	20 г
Спирт этиловый (96%-й)	200 мл
Аммония оксалат [$(NH_4)_2C_2O_4$]	8 г
Дистиллированная вода	800 мл

Растворить кристаллвиолет, растирая в ступке с добавлением спирта, а оксалат — в воде; смешать оба раствора и через сутки профильтровать готовый краситель.

Иодный раствор

Иод (кристаллический I_2)	20 г
Натрия гидроокись (1N раствор)	100 мл
Дистиллированная вода	900 мл

Растворить иод в щелочи, добавить воду. Хранить при комнатной температуре в емкости из темного стекла.

Для обесцвечивания используют чистый ацетон.

Водно-спиртовой раствор сафранина готовят, как в предыдущей методике.

Мазки, окрашиваемые по Аткинсу, более устойчивы к обесцвечиванию, так как фиксирующий раствор более прочно удер-

живает генцианвиолет. Это особенно важно для бактерий с повышенной чувствительностью к обесцвечиванию (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus* spp.). Метод Аткинса не дает преимуществ при окрашивании грамотрицательных микроорганизмов, более того, выявление таких микроорганизмов может быть осложнено в некоторых материалах, например мазках крови.

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.

Обнаружение кислотоустойчивых бактерий требует специальных методов окраски.

Окраска по Цилю — Нильсену. Метод используется для выявления кислотоустойчивых микобактерий (возбудителей туберкулеза, микобактериозов, лепры), актиномицетов и некоторых других микроорганизмов. Кислотоустойчивость микроорганизмов обусловлена наличием в их клетках липидов, воска и оксикислот. Такие микроорганизмы плохо окрашиваются разведенными растворами красителей. Для облегчения проникновения красителя в клетки микроорганизмов нанесенный на препарат феноловый фуксин Циля подогревают над пламенем горелки.

Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спирта.

Окраска микроорганизмов по методу Циля — Нильсена включает следующие этапы.

1. Фиксированный мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги и наливают на нее феноловый фуксин Циля (можно пользоваться фильтровальной бумагой, предварительно пропитанной красителем и высушенной). Мазок подогревают над пламенем горелки до появления паров, затем отводят в сторону для охлаждения и добавляют новую порцию красителя. Подогревание повторяют 2 — 3 раза. После охлаждения снимают фильтровальную бумагу и промывают препарат водой.

2. Препарат обесцвечивают путем погружения или нанесения на него 5%-го раствора серной кислоты (или 1%-м соляно-кислым спиртом) и промывают несколько раз водой.

3. Окрашивают препарат водно-спиртовым раствором метиленового синего 3 — 5 мин, промывают водой и высушивают.

При окраске по методу Циля — Нильсена кислотоустойчивые бактерии приобретают интенсивно красный цвет, остальная микрофлора окрашивается в светло-синий цвет (см. цв. вклейку, рис. 3).

Окрашивание спирохет и простейших традиционно ведется с применением особых красителей.

Окраска по Романовскому — Гимзе. Мазки из исследуемого материала (кровь, гной, тканевая жидкость и др.) высушивают на

воздухе, фиксируют метиловым спиртом в течение 3 мин, снова высушивают на воздухе и окрашивают. Обработку мазков удобно производить в чашках Петри, на дно которых положены две подставки (из предметного стекла, разрезанного вдоль пополам). Препарат кладут мазком вниз на подставки и сбоку подливают разведенный краситель так, чтобы мазок соприкасался с ним. Окраска длится от 30 мин до одного или нескольких часов, после чего мазки промывают водой и высушивают на воздухе.

Краситель Романовского — Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает в разные цвета элементы микроорганизма и форменные элементы крови. Перед обработкой препарата краситель разводят водой (pH 7,0 — 7,2) в 10 — 20 раз. Степень разведения меняется в зависимости от серии красителя и pH воды. Поэтому рекомендуют каждую новую серию красителя и воду проверять на контрольных мазках крови.

Цитоплазма простейших при окраске методом Романовского — Гимзы приобретает голубой цвет, а ядра — красный. Элементы крови окрашиваются следующим образом: эритроциты — в розовый цвет, ядра лейкоцитов — в фиолетовый, цитоплазма — в голубой, базофильная зернистость — в синий, эозинофильная — в красный, нейтрофильная — в сиреневый.

Окраска по Морозову методом серебрения. Метод применяется для выявления путем импрегнации серебром спирохет, вирусов и микроструктур бактерий (жгутиков, включений). Готовят следующие растворы.

Раствор № 1

Ледяная уксусная кислота	25 мл
Формалин (40%-й)	2 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор № 2

Танин	5 г
Жидкий фенол	1 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор № 3

К 5%-му раствору нитрата серебра по каплям добавляют раствор аммиака до легкой опалесценции (готовят *ex tempore*).

Высушенный на воздухе мазок фиксируют раствором № 1 в течение 1 мин, промывают водой, затем на препарат наливают раствор № 2 (для протравливания), подогревают до появления паров и тщательно промывают водой. Для окраски серебрением используют раствор № 3, который наливают на препарат и подогревают до появления темно-коричневого цвета. После этого препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.