

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Санитарно-бактериологический контроль
и микробиологические методы исследования

Практическое пособие для студентов

Специальность «Фармация» (011600)

Воронеж
2003

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Тема 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ И ИХ ОБОРУДОВАНИЕ	4
Тема 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ	9
Тема 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	17
Тема 4. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ	23
Тема 4.1. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ.....	23
Тема 4.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ.....	24
Тема 5. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ	31
Тема 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АНТИСЕПТИКОВ, ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ	35
Тема 6.1. СТЕРИЛИЗАЦИЯ.....	35
Тема 6.2. ДЕЗИНФЕКЦИЯ.....	37
Тема 6.3. АСЕПТИКА И АНТИСЕПТИКА.....	38
Тема 7. САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	40
Тема 7.1. МИКРОФЛОРА ВОДЫ.....	43
Тема 7.2. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА.....	48
Тема 7.3. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ.....	50
Тема 7.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В АПТЕКАХ...	52
Тема 8. МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ТИТРОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (СЕРОДИАГНОСТИКА)	55
ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА	62

обеззараживанию загрязненного патогенным материалом платья, предметов рабочего инвентаря, рабочего места и частей тела, на которые попал заразный материал, осуществляются в присутствии врача-бактериолога.

8. При выполнении бактериологических работ нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с заразным материалом подвергать их дезинфекции; рабочее место в конце дня приводить в порядок и тщательно дезинфицировать, а заразный материал и культуры микробов, необходимые для дальнейшей работы, ставить на хранение в запирающийся рефрижератор или сейф.

9. Работники бактериологических лабораторий подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных болезней, возбудители которых могут встретиться в исследуемых объектах.

Оборудование микробиологических лабораторий

Лаборатории снабжены следующими приборами и аппаратами: биологическими иммерсионными микроскопами с дополнительными приспособлениями (осветитель, фазово-контрастное устройство, темнопольный конденсор и др.), люминесцентным микроскопом, термостатами, аппаратурой для стерилизации, рН-метрами, аппаратом для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифугами, техническими и аналитическими весами, аппаратурой для фильтрации (фильтр Зейтца и др.), водяными банями, холодильниками, набором инструментов (бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др.), лабораторной посудой (пробирки, колбы, чашки Петри, матрацы, флаконы, ампулы, пастеровские и градуированные пипетки) и др.

В лаборатории выделено место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы специальных красителей, спирт, кислоты, фильтровальная бумага и др. Каждое рабочее место снабжено газовой горелкой или спиртовкой и банкой с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими препаратами и другими лабораторными материалами. В крупных лабораториях имеются термостатные комнаты для массового выращивания микроорганизмов, постановки серологических реакций.

Для выращивания, хранения культур, стерилизации лабораторной посуды и других целей используется следующая аппаратура:

1. *Термостат.* Аппарат, в котором поддерживается постоянная температура. Оптимальная температура для размножения многих микроорганизмов 37 °С. Термостаты бывают воздушными и водяными.

2. *Ламинарбокс.* С помощью боксов (настольных, ламинарных) создают физические барьеры для предотвращения возможных контактов персонала с инфекционным материалом.

3. *Холодильники.* Используются в микробиологических лабораториях для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, крови, вакцин, сывороток и прочих биологически активных препаратов при температуре

около 4°C. Для хранения препаратов используются низкотемпературные холодильники, в которых поддерживается температура - 20 °C и ниже.

4. *Центрифуги.* Применяются для осаждения микроорганизмов, эритроцитов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии). В лабораториях используют центрифуги с различными режимами работы.

5. *Сушильно-стерилизационный шкаф (печь Пастера).* Предназначен для воздушной стерилизации лабораторной посуды и других материалов.

6. *Стерилизатор паровой (автоклав).* Предназначен для стерилизации паром под давлением. В микробиологических лабораториях используются автоклавы разных моделей (вертикальные, горизонтальные, стационарные, переносные).

Микроскопы и микроскопическая техника

Для микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный, темнопольный).

Они предназначены для изучения формы, структуры, размеров и других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2-0,3 мкм. Предельная разрешающая способность иммерсионного микроскопа - 0,2 мкм. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом 90 и окуляром 10 составляет: $90 \times 10 = 900$ крат.

Темнопольная микроскопия. Микроскопия в темном поле зрения основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля). Эффект достигается с помощью параболаид- или кардиоид-ковденсора, которые заменяют обычный конденсор в биологическом микроскопе.

Фазово-контрастная микроскопия. Фазово-контрастное приспособление дает возможность увидеть в микроскоп прозрачные объекты. Они приобретают высокую контрастность изображения, которая может быть позитивной или негативной. Позитивным фазовым контрастом называют темное изображение объекта в светлом поле зрения, негативным - светлое изображение объекта на темном фоне.

Люминесцентная (или флюоресцентная) микроскопия. Основана на явлении фотолюминесценции. Люминесценция - свечение веществ, возникающее после воздействия на них каких-либо источников энергии: световых, электронных лучей, ионизирующего излучения. Фотолюминесценция - люминесценция объекта под влиянием света. Если освещать люминесцирующий объект синим светом, то он испускает лучи красного, оранжевого, желтого или зеленого цвета. В результате возникает цветное изображение объекта. Длина волны излучаемого света (цвет люминесценции) зависит от физико-химической структуры люминесцирующего вещества. Первичная (собственная) люминесценция

наблюдается без предварительного окрашивания объекта, вторичная (наведенная) - возникает после обработки препаратов специальными люминесцирующими красителями - флюорохромами. Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычными методами обладает рядом преимуществ: возможностью исследовать живые микроорганизмы и обнаруживать их в исследуемом материале в небольших концентрациях вследствие высокой степени контрастности.

В лабораторной практике люминесцентная микроскопия широко применяется для выявления и изучения многих микроорганизмов.

Электронная микроскопия. Позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов. Световые лучи в таких микроскопах заменяет поток электронов, имеющий при определенных ускорениях длину волны около 0,005 нм, т. е. почти в 100 000 раз меньше длины волны видимого света. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически составляющая 0,1-0,2 нм, позволяет получить общее полезное увеличение до 10^9 крат.

Наряду с приборами «просвечивающего» типа используют сканирующие электронные микроскопы, обеспечивающие рельефное изображение поверхности объекта. Разрешающая способность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего» типа.

Принципы микробиологической диагностики инфекционных болезней

Лабораторная диагностика болезней человека основана на обнаружении в организме больного микроба, вызвавшего болезнь, микробных компонентов (антигенов) или продуктов жизнедеятельности (токсинов и др.) либо изменений в показателях гомеостаза под действием этого микроба (например, формулы крови, биохимического состава крови и др.).

Материалом для исследования в медицинской микробиологии служат различные биологические жидкости и другие материалы, взятые из макроорганизма (кровь, гной, моча, мокрота, ликвор, кал, рвотные массы, промывные воды и т.п.), и ткань, полученная методом биопсии от живого или аутопсии от трупа. В некоторых случаях на исследование берут объекты окружающей среды: воздух, воду, пищевые продукты, смывы и т.п.

Микробиологическая диагностика включает в себя 5 методов: микроскопический, культуральный, биологический, серологический и аллергический.

Микроскопический метод заключается в приготовлении микроскопических препаратов (нативных или окрашенных простыми или сложными способами) из исследуемого материала и их микроскопии с применением различных видов микроскопической техники (световая,