

Микроскопические методы исследования

Product Categories: [Обзор](#)

Product Page:

<http://ivdvlmedia.ru/shop/mikrobiologicheskaya-dagnostika/bakteriologiya/bakteriologicheskij-metod/obzor-bakteriologicheskij-metod/mikroskopicheskie-metody-issledovaniya/>

Product Summary

см. ниже описание

Product Description

Микроскопические методы 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 60х— 100х). 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. Разрешающая способность иммерсионного объектива около 0,2 мкм. Максимальное увеличение современных оптических микроскопов достигает 2000х —3000х.

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. 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 (40х). 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 $\frac{1}{4}$ 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. Большая 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 ультра-фиолет 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.

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 ультрамикротомов. Препараты контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ, используя разные методы: напыление тяжелых металлов, обработка фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетата том, солями осмиевой кислоты и др.