

Παρασκευή δειγμάτων για το φωτονικό
μικροσκόπιο.

Μικροσκοπική εξέταση νωπού
παρασκευάσματος.

Είδη χρώσεων μικροβίων και διαγνωστικές
εφαρμογές.



Κιμούλη Μαρία, MD, PhD
Επιμελήτρια Β' «Γ.Ν.Ν.Π. Άγιος Παντελεήμων»

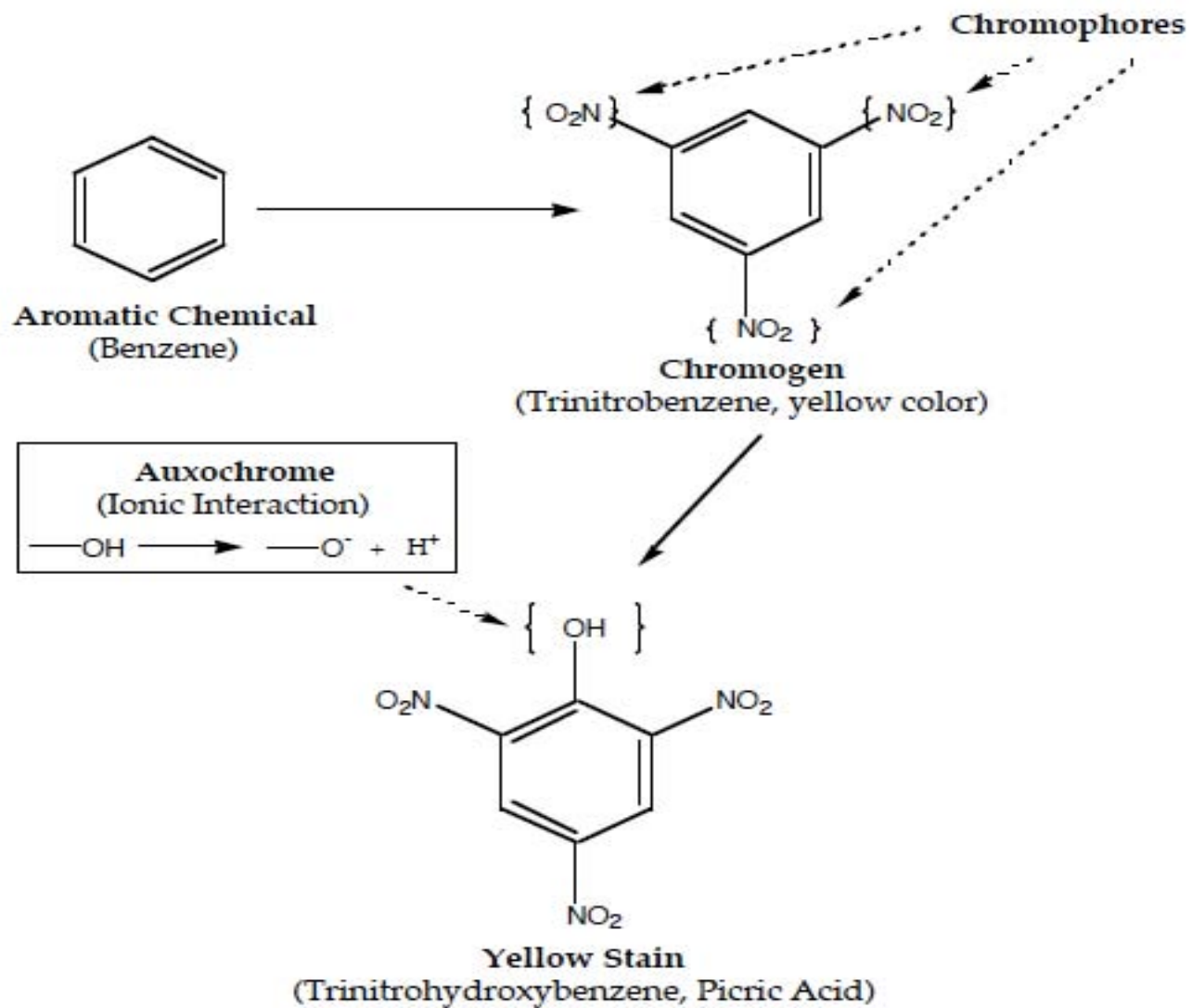
ΣΥΝΘΕΤΟ ΦΩΤΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

- *Χρησιμοποιεί το ορατό φως για την παρατήρηση των δειγμάτων με σαφή λεπτομέρεια.*

ΧΡΩΣΗ (STAIN)

- * Είναι η σήμανση των μικροοργανισμών με έγχρωμες ουσίες προκειμένου να αποκαλύψουμε τις δομές τους.
- * Μεταβολή του δείκτη διάθλασης των δειγμάτων από τον δείκτη διάθλασης του μέσου
- * Αποτέλεσμα: οι ακτίνες φωτός που περνούν από το κεχρωσμένο δείγμα ακολουθούν διαφορετική πορεία από αυτές που περνούν από το μέσο τους

ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

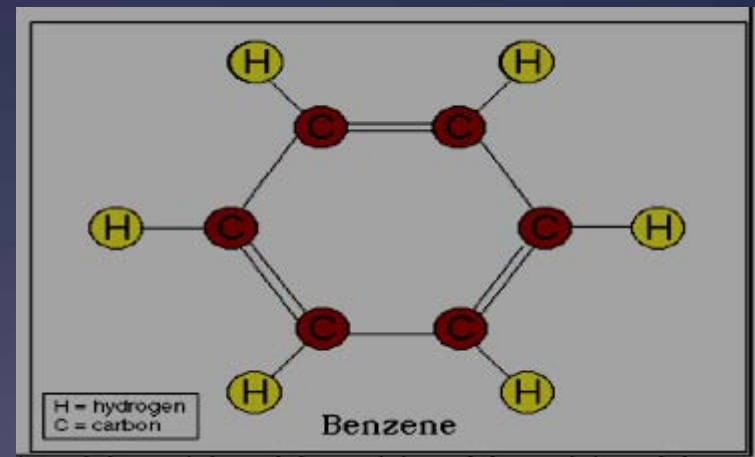


BENZOLIO (BENZENE) PhH ή ΦΗ

Το βασικό στοιχείο της χημικής δομής των χρωστικών.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

- * Ένας υγρός υδρογονάνθρακας C_6H_6 παράγωγο της λιθανθρακόπισσας.*
- * Απορροφά ηλεκτομαγνητική ενέργεια μη ορατή (200nm).*
- * Άχρωμος ουσία.*



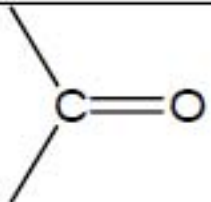
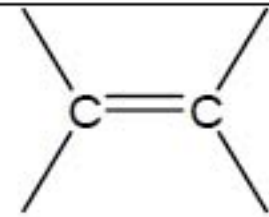
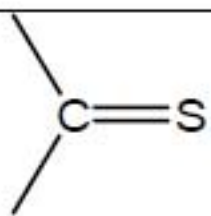
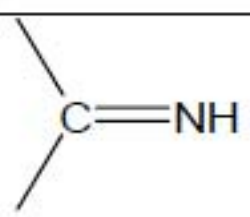
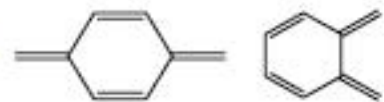
ΧΡΩΜΟΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ (Chromophores)

- * Χημική ομάδα που δίνει συγκεκριμένο **χρώμα** σε μια ένωση.
- * Η ένταση του χρώματος μιας χρωστικής εξαρτάται από τις χρωμοφόρες ομάδες που περιέχει.

Η σύζευξη δύο ή περισσότερων χρωμοφόρων ομάδων προκαλεί μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής σε **μικρότερα** ή **μεγαλύτερα μήκη κύματος**.

- **ΥΠΟΧΡΩΜΙΚΗ/ΜΠΛΕ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ**(hypochromic/blue shift)
- **ΒΑΘΥΧΡΩΜΙΚΗ/ΕΡΥΘΡΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ**(bathochromic/red shift)

ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΧΡΩΜΟΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

Όνομασία	Χημικός τύπος	Όνομασία	Χημικός Τύπος
Αζω-ομάδα	-N=N-	Καρβονυλική ομάδα	
Αζωάμινο-ομάδα	-N=N-NH	Ανθρακική ομάδα	
Νιτρωδό-ομάδα	-N=O -N-OH	Θειοσουλφονική ομάδα	
Νιτρο-ομάδα	-NO ₂	Ομάδα άνθρακας - άζωτο	
Κινοειδής δομή			

BENZENE



CHROMOPHORE



CHROMOGENE

ΑΥΞΟΧΡΟΜΕΣ ΟΜΑΔΕΣ (auxochromes)

- Είναι μιά ομάδα ατόμων, ιόντων, που μπορούν να είναι δέκτες ή δότες ηλεκτρονίων ή και τα δύο (έχουν μη δεσμικά ηλεκτρόνια σθένους).
- Μεταδίδουν την ιδιότητα του ηλεκτρολυτικού διαχωρισμού, τον διαχωρισμό του μορίου της χρωστικής στα συστατικά της ή σε άτομα, δημιουργώντας δεσμούς **αλάτων** με τα βακτήρια, **ενισχύοντας την αντίδραση ενός δείγματος με την χρωστική.**
- Δεν δίνουν χρώμα στην χρωστική αλλά επηρεάζουν την έντασή της.

Ενισχύουν τη δράση του χρωμοφόρου στο να απορροφήσει την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια.

ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΑΥΞΟΧΡΩΜΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

Όνομασία	Χημικός τύπος	Όνομασία	Χημικός τύπος
Πρωτοταγείς, Δευτεροταγείς, Τριτοταγείς αμίνες	-NH ₂ -NHR -NR ₂	Σουλφονική ομάδα	-SO ₃ H
Μεθυλομάδα	-CH ₃	Καρβοξυλομάδα	-COOH
Υδροξυλομάδα	-OH	Νιτροομάδα	-NO ₂

ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΒΕΝΖΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Βενζολικές ενώσεις: από δύο ή περισσότερους βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ισχυρούς χημικούς δεσμούς (*chromophores, auxochromes*)

➤ **Τολουόλη C_7H_8** -

αντικατάσταση H^+ με CH_3

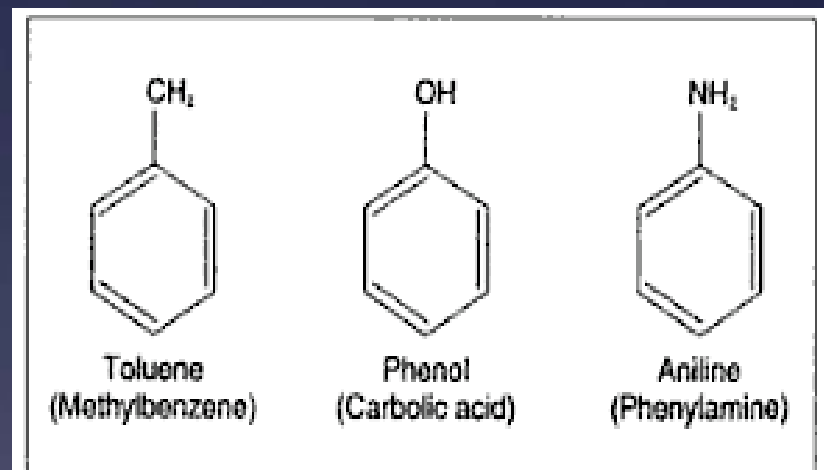
➤ **Φαινόλη C_6H_5OH** -

αντικατάσταση H^+ με OH

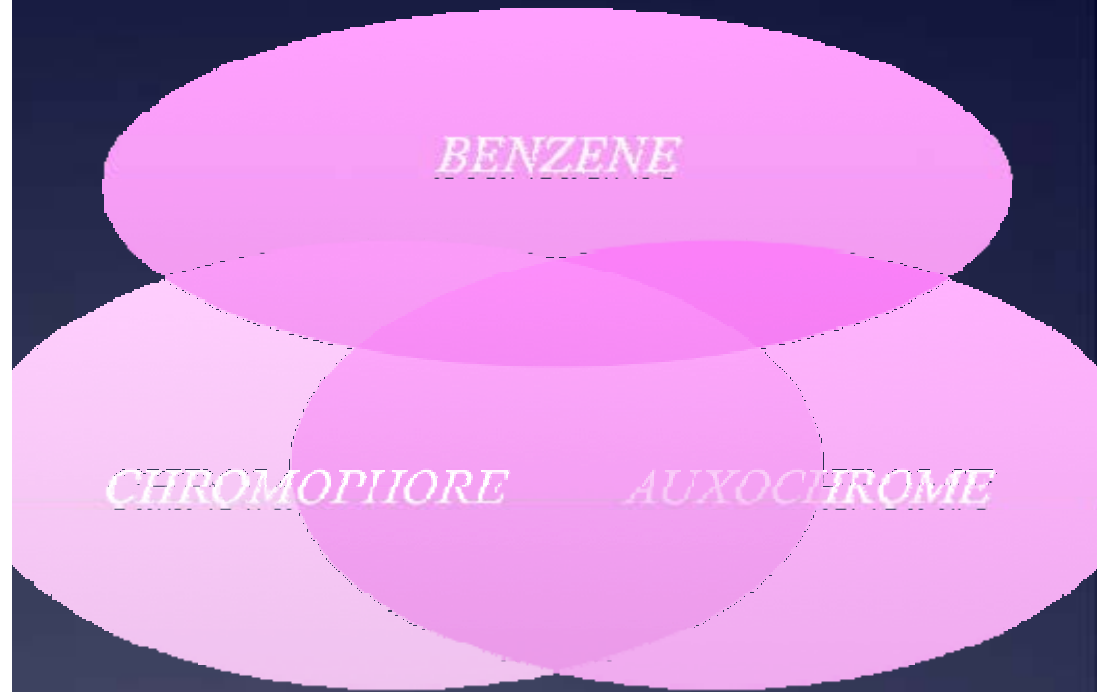
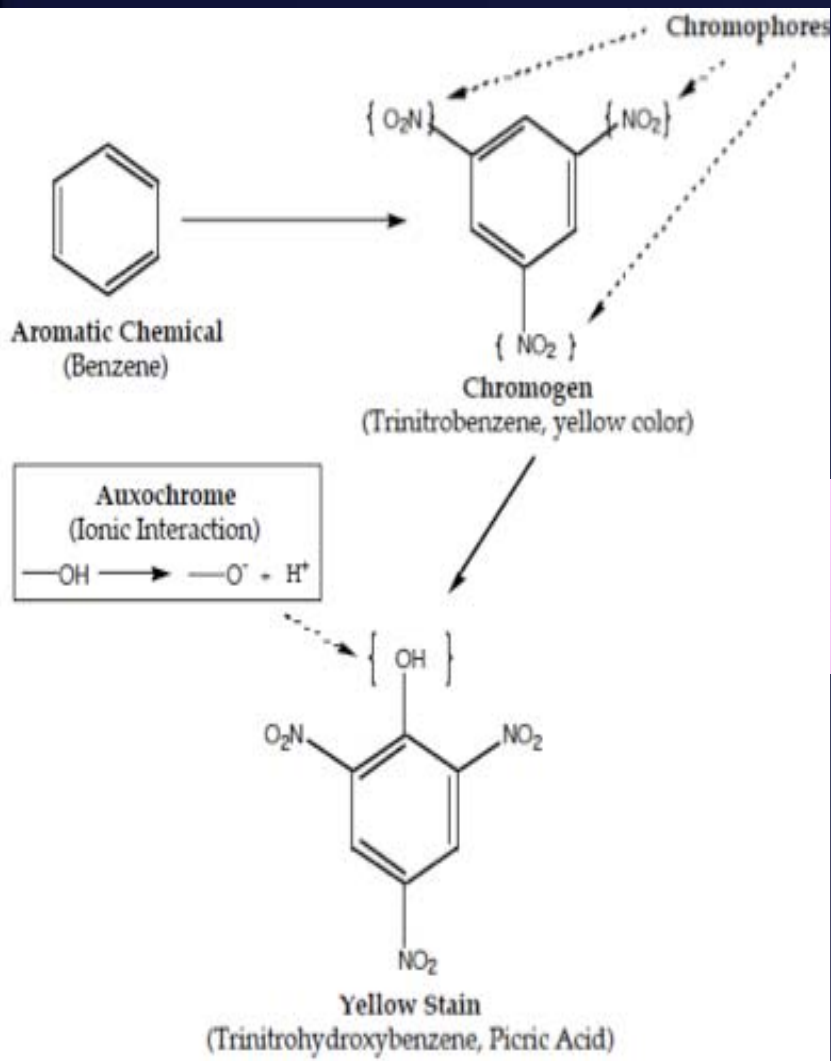
➤ **Ανιλίνη $C_6H_5NH_2$** (ελαιώδες υγρό) - τις περισσότερες χρωστικές στην Μικροβιολογία

αντικατάσταση H^+ με NH_2

ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΑΝΙΛΙΝΗΣ



ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ



ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

- Φυσικές
- Τεχνικές: είναι άλατα υπό μορφή σκόνης ή κρυστάλλων

ΒΑΣΙΚΕΣ: Αποτελούνται από **θετικό ιόν** (*cationic auxochrome*),

Όχι σύμφωνα με την αντίδρασή τους στο pH

Χρησιμοποιούνται περισσότερο από τις όξινες

Κυανούν του μεθυλενίου, κρυσταλλικό ιώδες, πράσινο του μαλαχίτη, σαφρανίνη

ΟΞΙΝΕΣ: Αποτελούνται από **αρνητικό ιόν** (*anionic auxochrome*)

Ηωσίνη, όξινη φουξίνη, νιγροσίνη

ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ΤΟΥ
ΠΥΡΗΝΑ

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ

ΓΙΑΤΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟ ΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ?

Τα βακτήρια είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένα σε pH 7

Το έγχρωμο θετικό ιόν σε μια βασική χρωστική έλκεται από τα αρνητικά φορτία του βακτηριακού κυττάρου.

Οι όξινες δεν προσελκύονται από τους περισσότερους τύπους βακτηρίων, επειδή τα αρνητικά ιόντα της χρωστικής απωθούν την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή επιφάνεια.

ΕΙΔΗ ΧΡΩΣΕΩΝ

- *Απλές*
- *Διαφορικές*
- *Ειδικές*

ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ – SIMPLE STAIN

- *Είναι υδατικά ή αλκοολικά διαλύματα μιας μόνο βασικής χρωστικής.*
- *Συνήθως μπλε του μεθυλενίου, βασική φουξίνη, κρυσταλλικό ιώδες.*
- *Μορφολογία των βακτηρίων (σχήμα, διάταξη).*
- *Στο μονιμοποιημένο δείγμα – για ΟΡΙΣΜΕΝΟ χρονικό διάστημα – ξέπλυμα – στέγνωμα – παρατήρηση*

SIMPLE STAIN

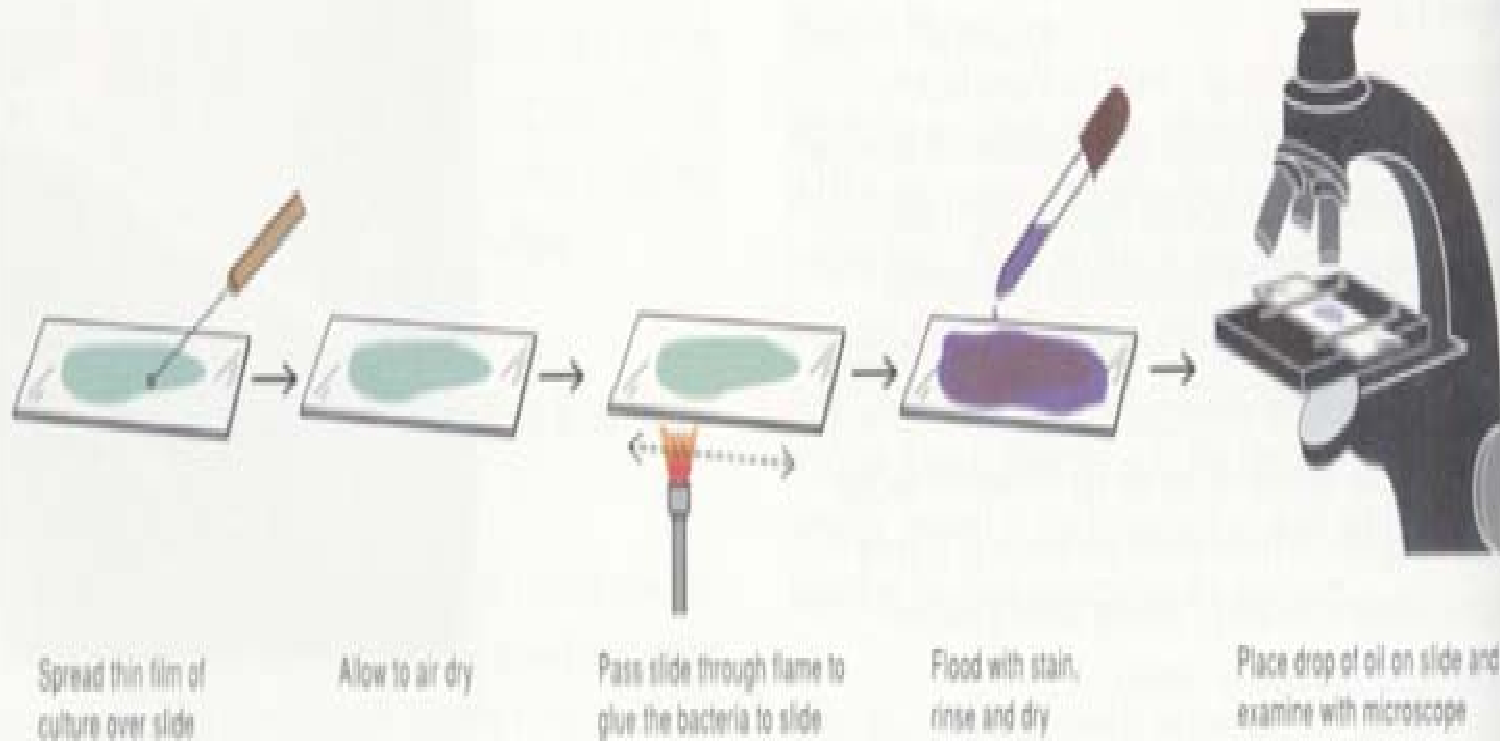


Figure 3.4

Steps in staining cells for microscopic observation.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

- *Η μονιμοποίηση των μικροοργανισμών σε αντικειμενοφόρο πλάκα.*
- *Σκοτώνει τα μικρόβια.*
- *Συντηρεί τα διάφορα μέρη των μικροβίων ("παγώνουν ").*
- *Heat fixing (θέρμανση σε φλόγα)*
- *Chemical fixing (με εφαρμογή διαλύματος μεθυλικής αλκοόλης για 1 min, διατήρηση έμορφων στοιχείων, καθαρό υπόστρωμα)*

ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

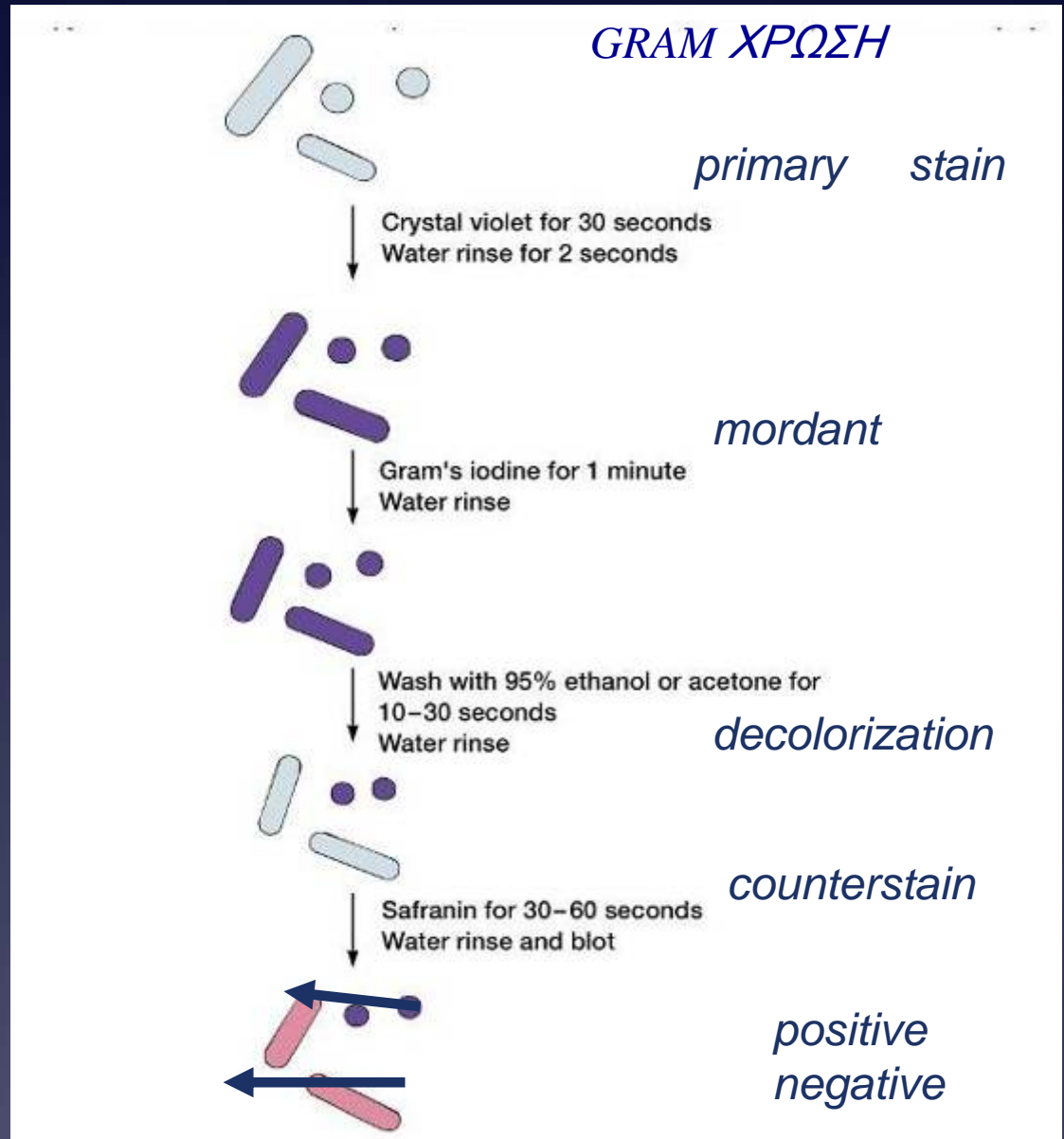
- *Αντιδρούν διαφορετικά στα διάφορα είδη μικροβίων.*
- *Χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό διαφορετικών ειδών μικροβίων.*
- *Gram χρώση, acid-fast stain.*

Κύρια χρωστική

Σταθεροποιητής

Αποχρωματισμός

Βασική – αντίθεσης χρωστική



Hans Christian Joachim Gram

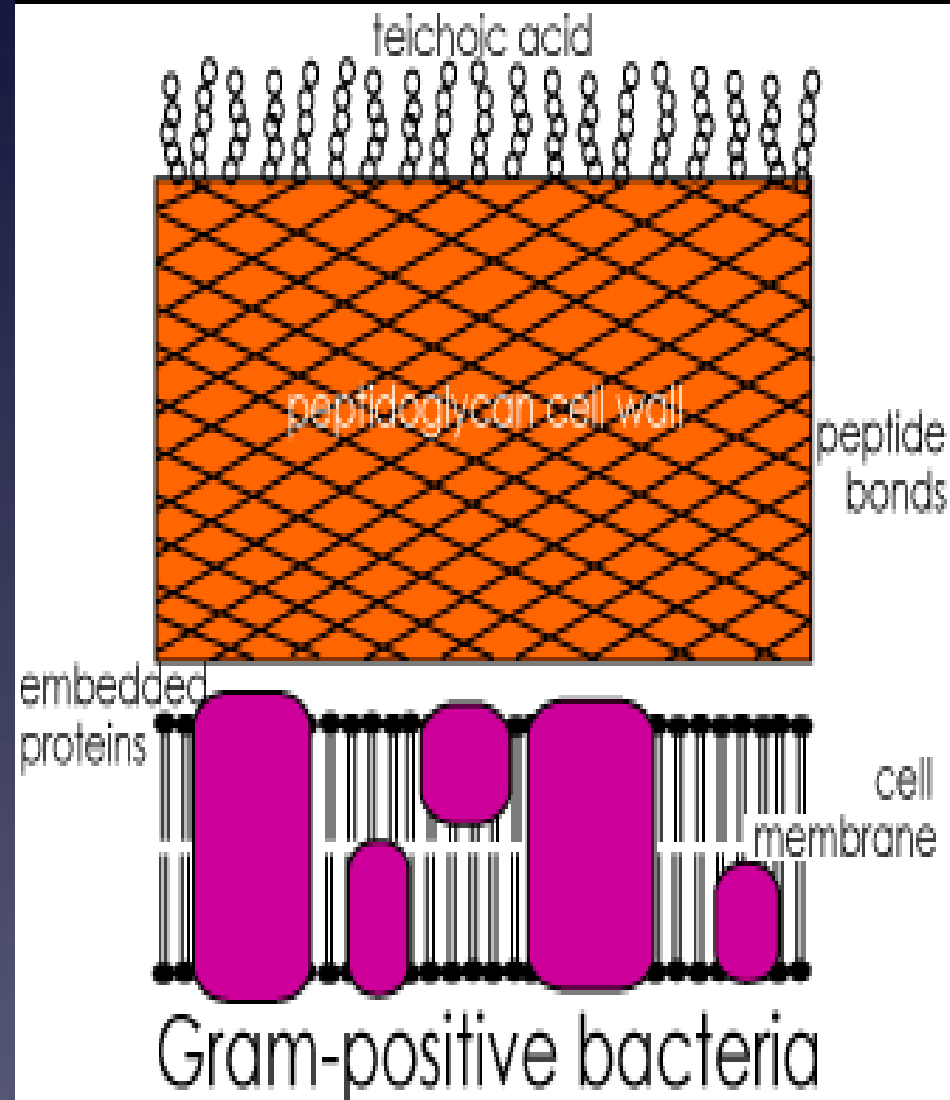
Danish Bacteriologist

Η Gram χρώση είναι πολύ σημαντική.

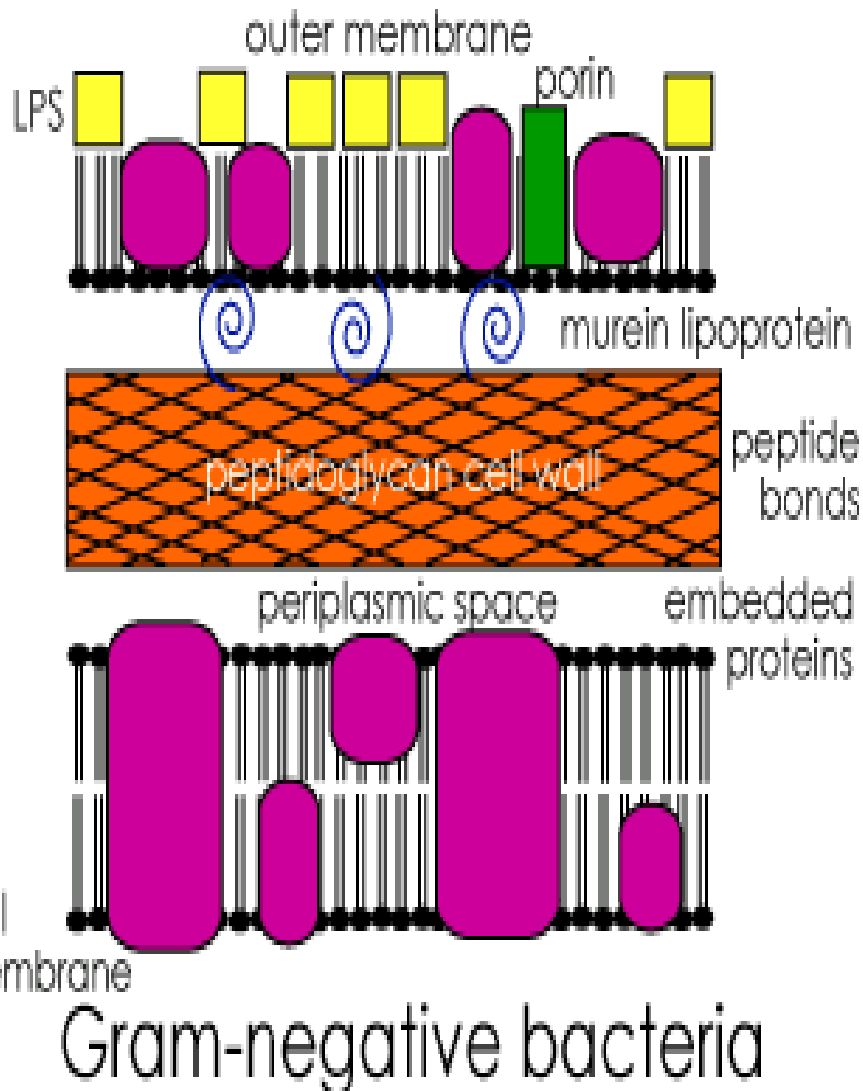
- Αναπτύχθηκε το 1884 από το Δανό βακτηριολόγο.
- Μία από τις πιο χρήσιμες χρώσεις της Μικροβιολογίας επειδή ταξινομεί τα βακτήρια σε δύο μεγάλες κατηγορίες.
- *Gram (+), Gram (-).*
- Ανακάλυψε ότι το *κρυσταλλικό ιώδες* χρωματίζει κάποια βακτήρια ενώ άλλα όχι μετά τον αποχρωματισμό.
- **Gram (+) θετικά** αυτά που διατηρούν το χρώμα , **Gram (-) αρνητικά** αυτά που όχι.

Κυτταρικό τοίχωμα Gram positive

- Gram positive βακτήρια έχουν ένα παχύ στρώμα **πεπτιδογλυκάνης** (παχιά άκαμπτη δομή).
- Η **πεπτιδογλυκάνη** (μουρείνη) αποτελείται από επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες συνδεδεμένους με πολυπεπτίδια (μονοσακχαρίτες NAG-NAM).
- **Τεχοϊκά οξέα:**
 - αλκοόλη + φωσφορική ομάδα.
 - αρνητικό φορτίο
 - αντιγονική ειδικότητα



Κυτταρικό τοίχωμα Gram Negative



- Gram negative βακτήρια έχουν **λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης** που συνδέεται με λιποπρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο.
- **Εξωτερική μεμβράνη** από λιποπολυσακχαρίτες-LPs, λιποπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια (αρνητικό φορτίο, αντιγονική ειδικότητα).
- Όχι τειχοϊκά οξέα.

Τι χρησιμοποιούμε σε μια χρώση Gram?

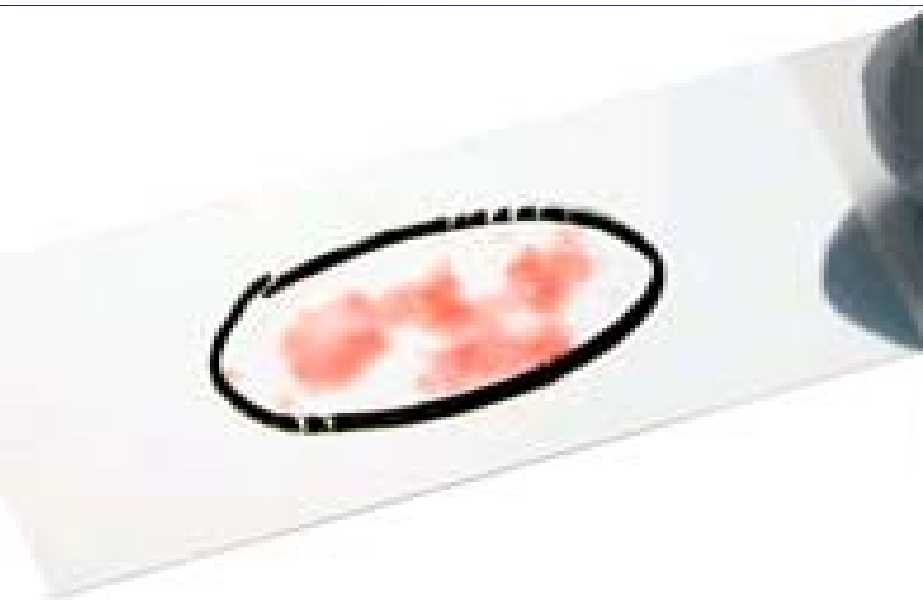


ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΣ Ο ΤΡΟΠΟΣ ΠΟΥ ΣΤΡΩΝΟΥΜΕ ΕΝΑ ΠΛΑΚΑΚΙ

ΛΑΘΟΣ



ΣΩΣΤΟ



ΒΗΜΑ 1:

Το μονιμοποιημένο δείγμα καλύπτεται από μια βασική ιώδη χρωστική συνήθως ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟ ΙΩΔΕΣ – ΚΥΡΙΑ ΧΡΩΣΤΙΚΗ για 10 sec.

Βάφει όλα τα κύτταρα.



**Gram-Stain
step 1**

Here crystal-violet dye is applied to the slide specimen beginning the Gram staining procedure.

ΒΗΜΑ 2:

Ξέπλυμα με νερό



**Gram-Stain
step 2**

The slide is washed with water for 10 sec. after having stained it with crystal-violet.

ΒΗΜΑ 3:

Το δείγμα καλύπτεται με ΙΩΔΙΟΥΧΟ ΔΙΑΛΥΜΑ για 10 sec

ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΤΗΣ



**Gram-Stain
step 3**

Gram's iodine is applied, and after one minute it is then washed off with tap water.

ΒΗΜΑ 4:

Ξέπλυμα με νερό



**Gram-Stain
step 4**

After the slide has been treated with Gram's iodine, it is washed off under tap water.

ΒΗΜΑ 5

ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ

*με ΑΛΚΟΟΛΗ ή διάλυμα ΑΛΚΟΟΛΗΣ-ΑΚΕΤΟΝΗΣ
αποχρωματίζει ορισμένα κύτταρα*



**Gram-Stain
step 5**

Here the slide is being "decolorized" using a mixture of ethanol and acetone.

ΒΗΜΑ 6:

Ξέπλυμα με νερό



**Gram-Stain
step 2**

The slide is washed with water for 10 sec. after having stained it with crystal-violet.

ΒΗΜΑ 7
ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ για 15 sec
ΒΑΣΙΚΗ ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ

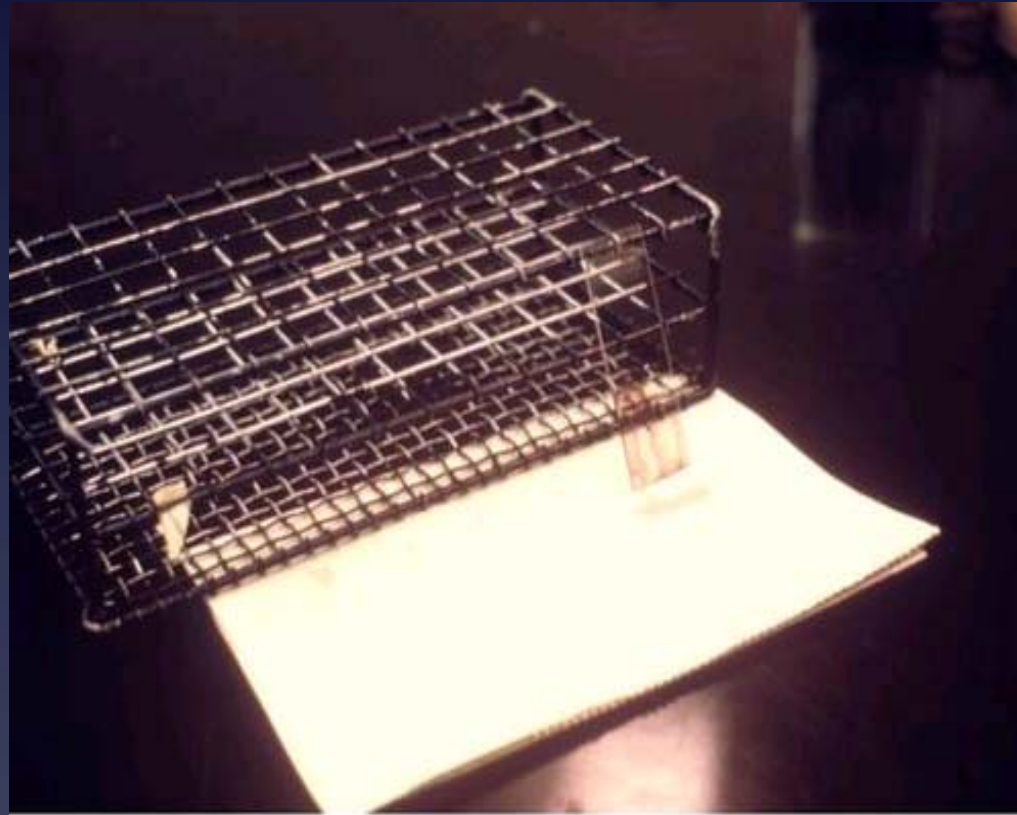


**Gram-Stain
step 6**

The counterstain Safranin is applied to the slide, imparting a pink color to Gram-negative bacteria.

ΒΗΜΑ 8

ξέπλυμα- στέγνωμα



**Gram-Stain
step 7**

The slides are finally dried after being stained, but a plastic rack is now used instead of metal.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ GRAM ΧΡΩΣΗΣ ΣΤΑ GRAM(+) ΚΑΙ GRAM(-)

ΙΩΔΗΣ
ΧΡΩΣΤΙΚΗ



ΙΩΔΙΟΥΧΟ
ΔΙΑΛΥΜΑ



ΣΥΜΠΛΟΚΟ
ΚΙ-ΙΔ

- Το σύμπλοκο συνδιάζεται στο κυτταρόπλασμα κάθε βακτηρίου και το χρωματίζουν *ιώδες ή σκούρο ερυθρό*.

ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ

- *Gram (+)* όταν διατηρούν το χρώμα της ιώδους χρωστικής γιατί το σύμπλοκο δεν μπορεί να εξέλθει από το παχύ στρώμα της πεπτιδογλυκάνης.
- *Gram (-) όταν αποχρωματίζονται*, γιατί το ξέπλυμα με αλκοόλη αναδιατάσσει το εξωτερικό στρώμα λιποπολυσακχαριτών και το σύμπλοκο εξέρχεται εύκολα από το κυτταρικό τοίχωμα.

Μετά τον αποχρωματισμό τα *Gram (-)* είναι άχρωμα και όχι ορατά.

ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ



ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΡΟΖ

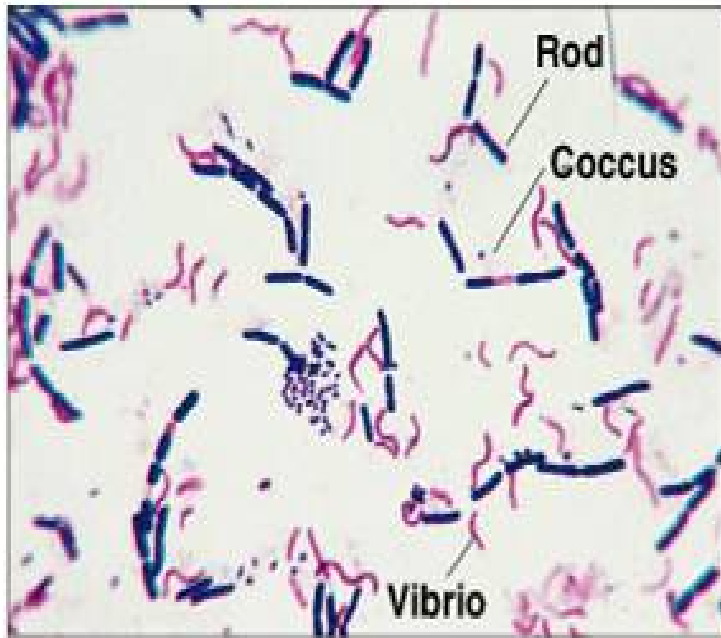
ΠΟΤΕ ΕΧΟΥΜΕ ΨΕΥΔΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ?

- ✓ Πρέπει quality control.
- ✓ Μη σωστή εφαρμογή της τεχνικής.
- ✓ Τα κύτταρα που χρωματίζονται είναι αυτά που βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης.
- ✓ Σε κάποιους πληθυσμούς κυττάρων μερικά gram θετικά θα εμφανιστούν ως gram αρνητικά.
- ✓ ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΗΘΩΣ ΝΕΚΡΑ
- ✓ Μερικά gram (+) παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό gram (-) κυττάρων όταν οι κ/ες γηράσκουν (*Bacillus spp*, *Clostridium spp*).

GRAM ΜΕΤΑΒΛΗΤΑ.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ GRAM ΧΡΩΣΗΣ

ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΒΑΜΜΕΝΑ ΚΑΤΑ GRAM



Στην απάντηση της μικροσκοπίσης μιας GRAM χρώσης, δεν δίνουμε τους μικροοργανισμούς με το είδος και το γένος αλλά μόνο περιγραφικά

Gram(+) κόκκοι: σε ζευγάρια, σε αλυσίδες, σε αθροίσματα

Gram(+) κοκκοβακτηρίδια, βακτηρίδια κορυνόμορφα σε L ή V σχηματισμούς

Gram(-) διπλόκοκκοι, βακτηρίδια, βακτηρίδια νηματοειδή, κοκκοβακτηρίδια με πολυμορφισμό

Βλαστοκύτταρα με εκβλαστήσεις, υφές

Χρώση κατά Ziehl–Neelsen

* Χρώση για οξεάντοχους μικροοργανισμούς: *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, **ωοκύστεις** *Cryptosporidium* & *Isosporabelli*.

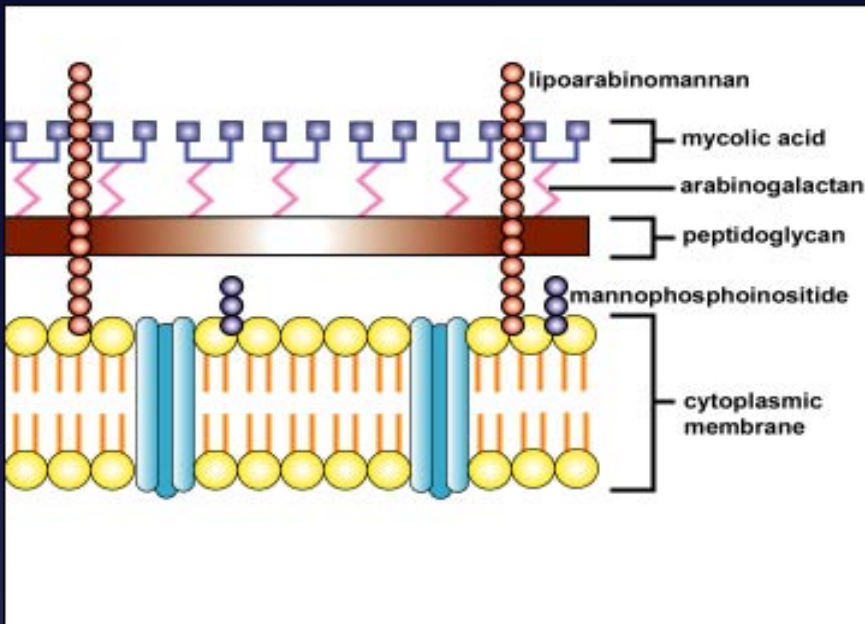
1. *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882)

2. *Mycobacterium leprae* (Hansen, 1874)

* Επινοήθηκε το 1882 από τους Franz Ziehl και Friedrich Neelsen

ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ACID FAST ΧΡΩΣΗ?

Οξεαντοχή= φυσική ιδιότητα μερικών μικροοργανισμών που αναφέρεται στην ανθεκτικότητά τους να μην απόχρωματίζονται κατά τη διαδικασία της χρώσης κατόπιν επεξεργασίας με οξέα. Είναι μια διαφορετική χρώση.



ΤΟΙΧΩΜΑ ΟΞΕΑΝΤΟΧΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΟΞΕΑΝΤΟΧΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

✓ Υψηλές συγκεντρώσεις 60% ενός υδροφοβικού λιπιδίου-**ΜΥΚΟΛΙΚΟ ΟΞΥ**

Αποτρέπει την απορρόφηση χρωστικών ουσιών (όπως gram χρώση).

→
✓ **ΜΥΚΟΛΙΚΟ ΟΞΥ+ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗ** είναι σε συνοχή με τη βοήθεια ενός πολυσακχαρίτη

Όταν χρωματισθούν εν θερμώ με μία ισχυρή βασική χρωστική (φαινικούχος φουξίνη) που διαπερνά αυτό το τοίχωμα, σχηματίζεται ένωση που δεν αποχρωματίζεται με οξέα.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΡΩΣΗΣ ΚΑΤ'Α ΖΙΕΗΛ-NEELSEN

- Μονιμοποίηση παρασκευάσματος με μεθανόλη.
- Κάλυψη με **πυκνή φαινικούχο φουξίνη**.
- Θέρμανση με φλόγα μέχρι να εμφανιστούν ατμοί- ενισχύεται η διείσδυση της χρωστικής.
- Ξέπλυμα με νερό.
- Αποχρωματισμός με οξυνισμένο οινόπνευμα.
- Ξέπλυμα με νερό.
- Χρωστική αντίθεσης- **κυανούν του μεθυλενίου** ή στίλβον πράσινο.
- Ξέπλυμα με νερό.
- Στέγνωμα-μικροσκόπηση.

ΤΑ ΜΗ ΟΞΕΑΝΤΟΧΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΜΠΛΕ ΕΝΩ ΤΑ ΟΞΕΑΝΤΟΧΑ ΚΟΚΚΙΝΑ.

*ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ
ΤΗΣ Ζ-Ν ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ
ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ
300 ΟΠΤΙΚΑ ΠΕΔΙΑ*



ΑΛΛΕΣ ΟΞΕΑΝΤΟΧΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ Z-N

Αποχρωματισμός με H_2SO_4 οξύ 2 -3 % δηλ διάλυμα αποχρωματισμού μικρότερης οξύτητας. *Nocardia, Rhodococcus, Tsucamurella, Gordonia, Diezia.*

KINYOUN – cold method

- Ιδιαίτερο διάλυμα φαινικούχου φουξίνης
- Όχι θέρμανση
- Ίδια ευαισθησία και ειδικότητα με την Z-N, πιο εύκολη στην εφαρμογή.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

Χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη συγκεκριμένων τμημάτων των μικροοργανισμών ή οργανιδίων (ενδοσπόρια, μαστίγια, έλυτρα)

ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

➤ ΧΡΩΣΗ ΕΝΔΟΣΠΟΡΙΩΝ

- ✓ Έχουν μια ειδική ανθεκτική δομή για να προστατεύουν το βακτηριακό κύτταρο από δυσμενείς περιβαντολογικές συνθήκες (εξειδικευμένα αδρανή κύτταρα).
- ✓ Οι περισσότερες χρωστικές δεν διαπερνούν το τοίχωμά τους.
- ✓ *Bacillus spp*, *Clostridium spp*.

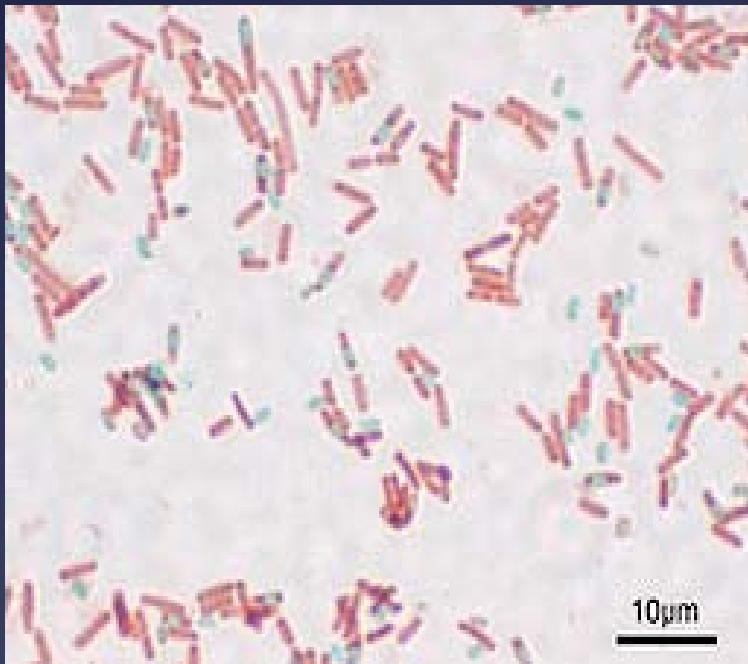
ΧΡΩΣΕΙΣ

- **SCHAEFFER-FULTON STAIN** (Wirtz–Conclin)
- *Moeller* (σαν την Z-N αλλά ο αποχρωματισμός με αλκοόλη)
- Τεχνική απλού παρασκευάσματος- διαθλούν ιδιαίτερα το φως

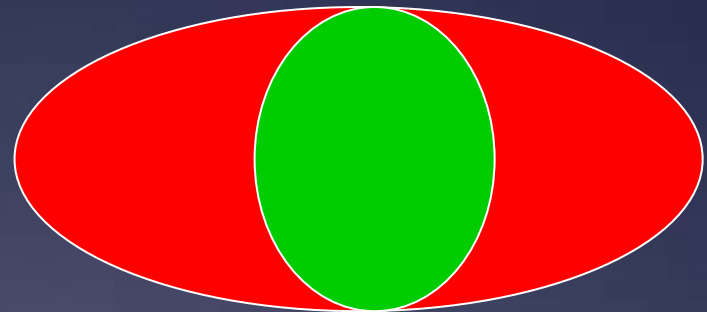
Endospore Schaeffer-Fulton Stain

ΤΕΧΝΙΚΗ:

- ✓ Πράσινο του μαλαχίτη σε μονιμοποιημένο δείγμα με **θέρμανση** μέχρι βρασμού 5 min
- ✓ Ξέπλυμα με νερό για 30sec
- ✓ Χρωστική αντίθεσης- **σαφρανίνη**



Bacillus pumilus



ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

➤ ΓΙΑ ΤΟ ΕΛΥΤΡΟ (CAPSULE STAIN)

- ✓ Το ζελατινώδες περίβλημα των μικροοργανισμών εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος από πολυσακχαρίτες, πολυπεπτίδια.
- ✓ Προσδιορίζουν την παθογονικότητα του μικροβίου.
- ✓ Η χρώση του δύσκολη καθώς τα συστατικά του είναι υδατοδιαλυτά.

ΧΡΩΣΕΙΣ

➤ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ

Χρώση κατά *Muir*

Χρώση κατά *Hiss*

Χρώση κατά *Maneval*

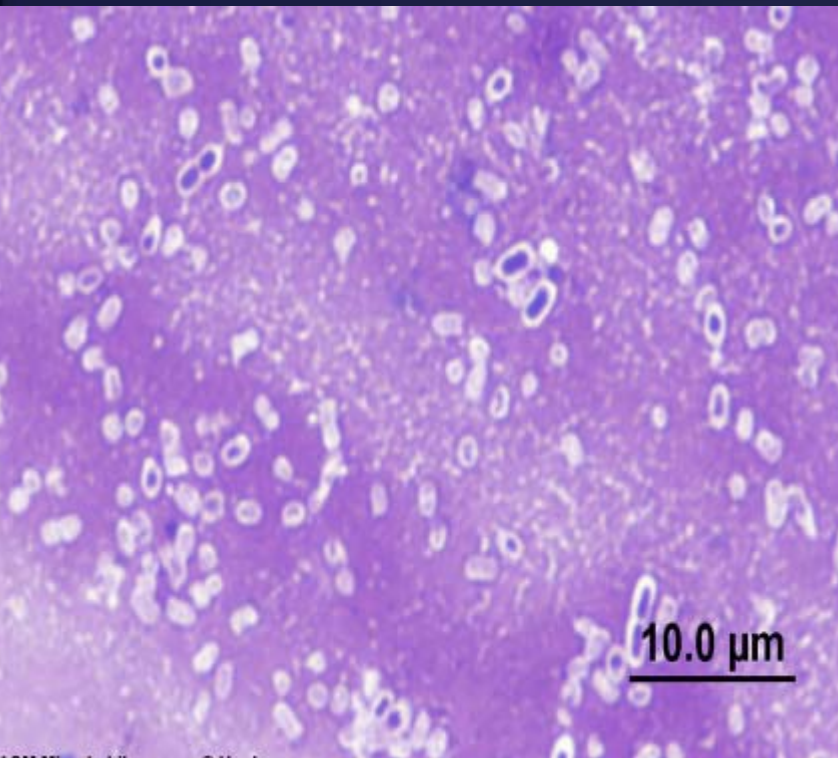
Χρώση κατά *Anthony*

Capsule stain

Έλυτρο= γαλάζια άλω

Μικρόβιο= σκούρο μπλε ή μωβ

Klebsiella pneumoniae with Antony's capsule stain



Bacillus spp with Maneval's method



ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

➤ ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΜΑΣΤΙΓΙΑ (βλεφαρίδες, flagella stain).

- ✓ Είναι υπεύθυνα για την κίνηση των βακτηριδίων
- ✓ Όχι σε όλα τα προκαρυωτικά
- ✓ Διαγνωστικά στοιχεία είναι ο αριθμός τους και η κατανομή τους γύρω από το βακτηριακό κύτταρο (κυρίως για τα κινητά αζυμωτικά)

- ✓ Είναι πολύ μικρά οργανίδια που πριν την χρώση πρέπει να σταθεροποιηθούν = προκαλείται διόγκωση

ΧΡΩΣΕΙΣ

➤ *Leifson stain (βασική φουξίνη)*

➤ *Ryu method*

➤ *Τεχνική απλού παρασκευάσματος κατά Mayfield and Innis*

} απλές

ΑΛΛΕΣ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

➤ Για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία κορυνοβακτηριδίων
Διαγνωστικό για το *Corynebacterim diphtheriae*

✓ Stoltenberg (μέθοδος εκλογής)

✓ Neisser

✓ Loeffler

➤ Για τα κοκκία λίπους

Sudan Black B(υδρόφοβη χρωστική)

Corynebacterim diphtheriae-Stoltenberg stain



ΑΛΛΕΣ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

➤ GIMENEZ

Χρώση για *Chlamydia*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Legionella pneumophila*

➤ Castaneda-Macchiavello

Χρώση για *ιών*, *ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ*

➤ Gomori (αργυρούχος μεθαμίνη), Toluidine blue O (σε δείγματα του ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ)

Χρώση για *P. jiroveci*

➤ M' Fadyen (τροποποίηση του κυανού του μεθυλενίου)

Χρώση για τον *Bacillus anthracis*

➤ Χρωστική λακτοφαινόλης

Χρώση για μύκητες

➤ Wayson (τροποποίηση του κυανού του μεθυλενίου)

Άμεση χρώση CSF για βακτήρια και αμοιβάδες, *Yersinia pestis* σε ιστούς

➤ Τρίχρωμη χρώση για τα εντερικά παράσιτα

Wheatley, Weber-Green, Ryan-Blue

➤ Periodic acid-Schiff

Για μύκητες σε ιστούς

ΑΛΛΕΣ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

ΧΡΩΣΗ GIEMSA

Giemsa powder - 3.8 gms

Glycerol - 250 ml

Methanol - 250 ml

- ✓ Παράσιτα του αίματος: πλασμώδια, μπαμπέσιες, τρυπανοσώματα, λεισμάνιες, μικροφιλάριες
 - ✓ *Histoplasma capsulatum*
 - ✓ *Pneumocystis jirovecii*
 - ✓ Για κυτταρικά ή ενδοπυρινικά έγκλειστα ιών
-
- Με παρασκευάσματα από το περιφερικό αίμα
 - Παχιά (ήπια παρασιταιμία)-λεπτή σταγόνα(μορφολογία)
 - Το πρωτόπλασμα των πρωτοζώων χρωματίζεται γαλάζιο ενώ ο πυρήνας κόκκινος

ΝΩΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ

Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος βιολογικών υγρών

- ✓ Η παρουσία μικροοργανισμών.
- ✓ Η μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών.
- ✓ Διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

ΑΠΛΟ ΝΩΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ ΜΕ NaCl 0,85%

WET MOUNT, *Hanging drop procedure*

- ✓ Βιολογική δραστικότητα – κίνηση, μορφολογία.
- ✓ Ορολογική δραστικότητα – με τους ειδικούς αντιορούς.
- ✓ Μειονέκτημα στεγνώνει εύκολα.

Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος

➤ Νωπό παρασκεύασμα με διάλυμα ΚΟΗ 10%

Potassium Hydroxide mount

- Μια ισχυρή αλκαλική και καυστική ένωση
- Καταστρέφει τα περισσότερα οργανικά υποστρώματα του κλινικού δείγματος **εκτός από τους μύκητες** (χιτίνη κυτταρικού τοιχώματος)
- Ενισχύεται η διαύγηση του κλινικού δείγματος με την θέρμανση
- Μαζί με μαύρη μελάνη Parker για *Malassezia furfur* σε ξέσματα από το δέρμα
- Βιοπτικό υλικό, λέπια δέρματος, νύχια, τρίχες, πτύελα

Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος.....

➤ Νωπό παρασκεύασμα με ΣΙΝΙΚΗ ΜΕΛΑΝΗ ή νιγροσίνη
India Ink Preparation -ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ

- Ταχεία ανίσχυση των ελυτροφόρων βλαστοκυττάρων
- *Cryptococcus neoformans*
- Στο ENY από το ίζημα

ΤΕΧΝΙΚΗ

Σταγόνα κλινικού δείγματος αναμειγνύεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με σταγόνα σινικής μελάνης και μικροσκοπείται.

➤ Το έλυτρο δεν προσλαμβάνει τα σωματίδια του άνθρακα της σινικής μελάνης, έτσι δημιουργείται μια καλά περιγεγραμμένη διαυγής άλως γύρω από τα βλαστοκύτταρα.

Cryptococcus neoformans



Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος.....

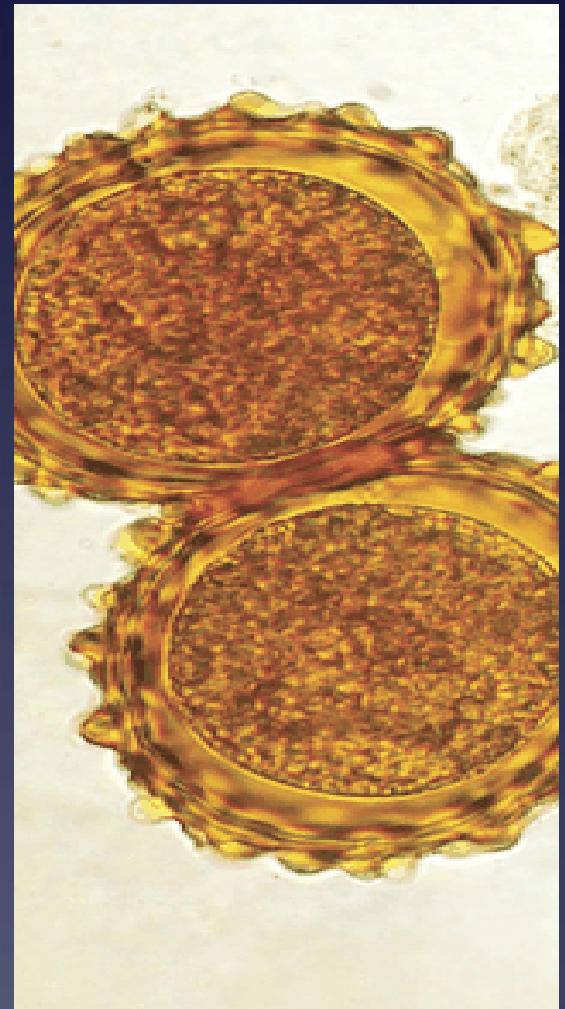
➤ Νωπό παρασκεύασμα με διάλυμα Lugol *Lugol's iodine (αραιωμένο 1:5)*

- Πρωτόζωα ή ωάρια ελμίνθων σε παρασιτολογική
- Κοκκία αμύλου σε λειτουργική κόπρανων
- *Lugol d' Antoni*

- **ΤΕΧΝΙΚΗ:** *Ιώδια (κρύσταλλοι) 5 g- Ιωδιούχο κάλι 10 g*
-Νερό απεσταγμένο 100ml

Διαλύεται το ιωδιούχο κάλι στο νερό και προστίθενται οι κρύσταλλοι, φυλλάγεται σε σκουρόχρωμη φιάλη

Αυγά από *Ascaris spp.* σε ανθρώπινα κόπρανα μετά από χρώση Lugol.

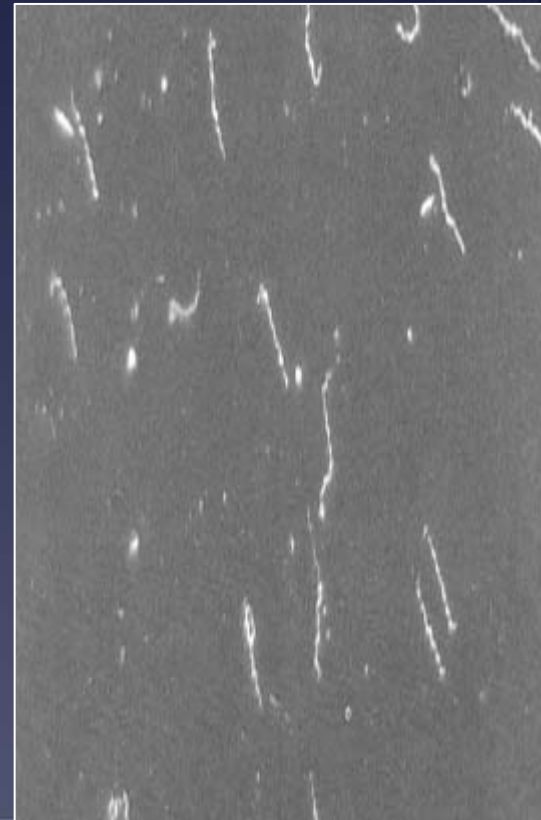


Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος.....

➤ Νωπό παρασκεύασμα σε σκοτεινό οπτικό πεδίο DARKFIELD EXAMINATION

Treponema palidum: δεν δρα πολύ έντονα το φως γι αυτό λέγεται ωχρά. Σαν λευκά διαθλαστικά σώματα που κινούνται.

- Από το συφιλιδικό έλκος εξίδρωμα χωρίς ερυθρά αιμοσφαίρια, μικρή σταγόνα σε αντικειμενοφόρο πλάκα, καλυπτρίδα, μικροσκόπηση με καταδυτικό φακό και συμπυκνωτή σκοτεινού πεδίου.



Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος.....

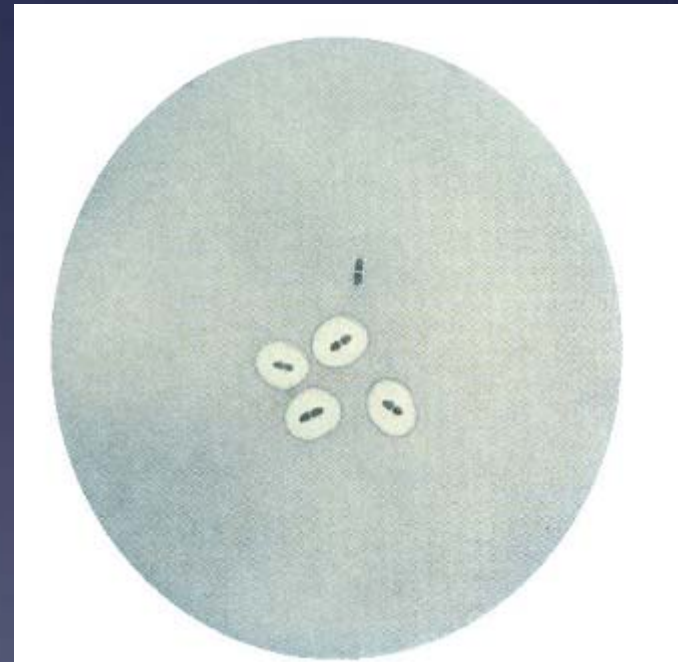
➤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ NEUFELD'S

- ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΞΟΙΔΗΣΕΩΣ ΤΟΥ ΕΛΥΤΡΟΥ (*quellung*)
με ορό που περιέχει ομόλογο αντικαψιδικό αντίσωμα
(νωπό παρασκεύασμα)
- *S. pneumoniae*, *H. influenzae*

ΤΕΧΝΙΚΗ:

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα πυκνό εναιώρημα από το καλιέργημα ή το παθολογικό υλικό (πολλές σταγόνες)+τους πολυδύναμους αντί-ορούς κατά των αντιγόνων του ελύτρου των διαφόρων τύπων του πνευμονιοκόκκου, καλυπτρίδα, σε τρυβλίο με βρεγμένο βαμβάκι, στον κλίβανο 37⁰ C για 30 min.
Μικροσκοπούμε με ξηρό και καταδυτικό για διόγκωση των διπλοκόκκων σε σχέση με το μάρτυρα.

Photomicrograph of pneumococci revealing capsular swelling using the Neufeld-Quellung test.



ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ

Δεν φυγοκεντρούμε-καλή ανάδευση-στρώσιμο σταγόνας σε αντικειμενοφόρο πλάκα
Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου 1 μικρ/σμός ανά οπτικό πεδίο (X1000) σε αφυγοκέντρητα ούρα~ 10^5 ml σε καλλιέργεια
-GRAM χρώση(95% ευαισθησία)

Προστατικό υγρό

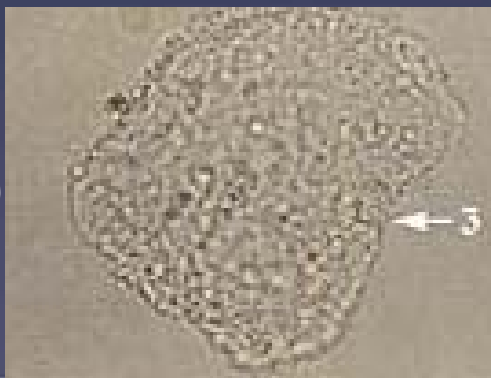
GRAM-*Neisseria gonorrhoea*



Δείγματα από το γεννητικό σύστημα της γυναίκας

Σε κολπικό επίχρισμα

- Νωπό παρασκεύασμα (clue cells....)
- Gram χρώση



ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΕΝΥ (και άλλα βιολογικά υγρά)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ σε κυτταροφυγόκεντρο ή απλή

-GRAM stain

-Quellung αντίδραση για πνεμονοκοκκική μηνιγγίτιδα

-Αρνητική χρώση για *Cryptococcus neoformans*.....

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Δείγματα για μύκητες (τρίχες, νύχια, δέρμα)

- 10% ΚΟΗ-χρωστική λακτοφαινόλης

Δείγματα κοπράνων

- καλή ανάδευση (λεπτή επίστρωση)
- Gram χρώση, απλό νωπό παρασκεύασμα, με Lugol



Cambylobacter jejuni- gram stain

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ρινικό, ρινοφαρυγγικό, φαρυγγικό, στοματικό

ΩΤΙΚΑ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΑ

– GRAM ΧΡΩΣΗ

Δείγματα με βαμβακοφόρο σπειρό: τοποθέτηση σε αποστειρωμένο σωληνάριο με μικρή ποσότητα φυσιολογικό ορό, ξεπλύνουμε τον σπειρό, απόρριψη περίσσειας υγρού, επίστρωση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, καλλιέργεια



Streptococcus pyogenes-gram stain

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

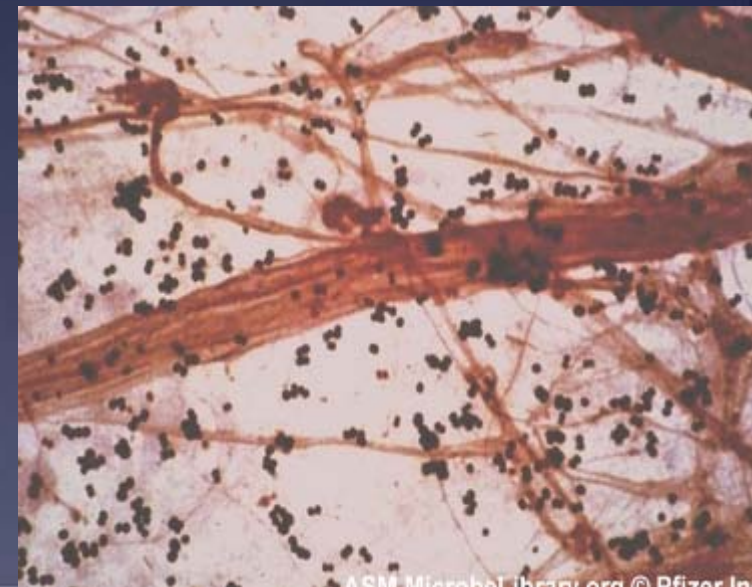
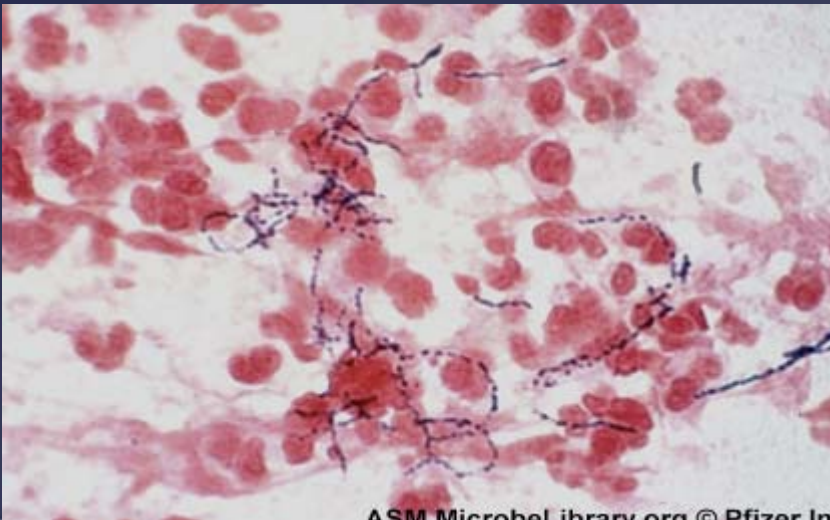
Πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις (δείγματα όχι σε στείλεό)

GRAM ΧΡΩΣΗ- καταλληλότητα του δείγματος κατά Bartlett και κατά Murray
Washington- βακτήρια

Οξεάντοχη χρώση

S.aureus-gram σε πτύελα

Nocardia asteroides-gram σε πτύελα



ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ-

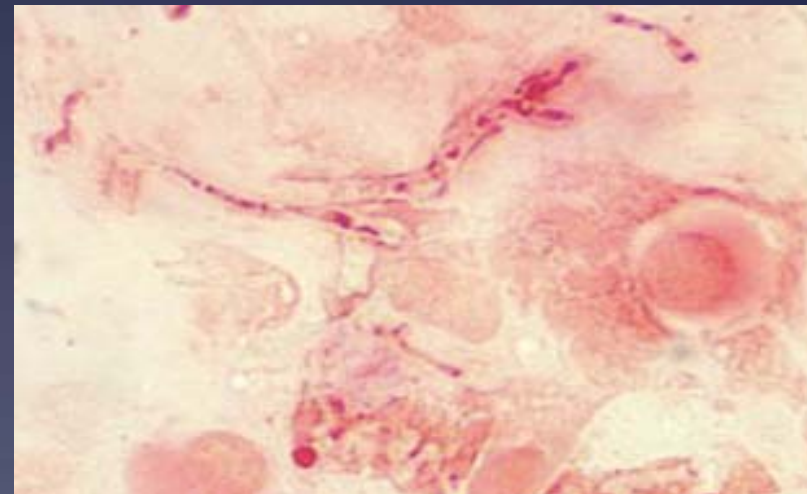
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΛΑΚΩΝ

ΜΟΡΙΩΝ (απόστημα, ελκωτική βλάβη)

GRAM ΧΡΩΣΗ

ΟΦΘΑΛΜΙΚΑ (βιοπτικό υλικό, στειλεός, ξέσματα)

Εντυπώματα-GRAM χρώση



Aspergillus fumigatus-gram stain

*ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ-
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ-*

ΑΙΜΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

*- ΑΜΕΣΗ GRAM ΧΡΩΣΗ ΣΤΗ ΘΕΤΙΚΗ ΦΙΑΛΗ ΑΠΟ
ΤΟ ΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....*

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΧΡΩΣΕΩΝ

*Καθαρισμός αντικειμενοφόρων πλακών
από το λάδι με XYLENE και φύλαξη στις
ειδικές θήκες για να μην ξεθωριάσουν.*

