

# Επαναλαμβανόμενο Ενιαίο Πρόγραμμα Μαθημάτων Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας

ΧΡΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ  
- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ -

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΝΩΠΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ



Dr ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ - ΑΘΑΝΑΣΟΥΛΗ  
Αναπληρώτρια Διευθύντρια Νοσ. Παίδων «Αγία Σοφία»

# ΧΡΩΣΕΙΣ

- Οι χρώσεις πρωτοχρησιμοποιήθηκαν πριν 150 χρόνια
- Μέσω αυτών γίνονται ορατά με τη βοήθεια μικροσκοπίου ποσοτικά & ποιοτικά χαρακτηριστικά που αφορούν:
  - την μορφή
  - τη διάταξη των δομών σε βιολογικά παρασκευάσματα

# Χρωστικές – Χρωστικά διαλύματα

- Φέρονται υπό μορφής σκόνης ή κρυστάλλων

- Φυσικές

- ζωικής
- φυτικής προέλευσης (αιματοξυλίνη, καρμίνιο)

- Τεχνητές (υπό μορφή αλάτων & χρησιμοποιούνται ως διαλύματα)

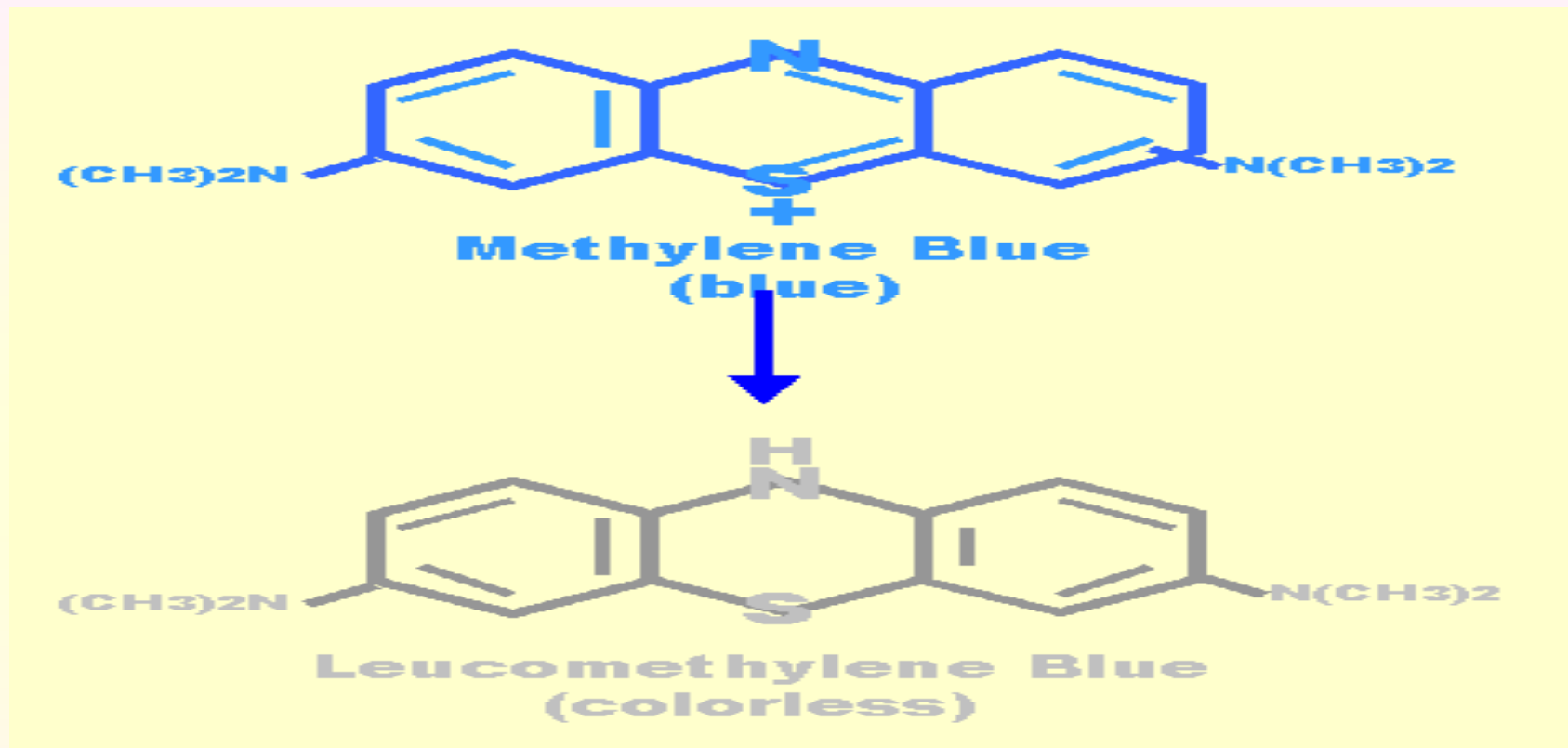
- βασικές
- όξινες
- ουδέτερες

Προηγείται η παρασκευή μητρικών διαλυμάτων, (κεκορεσμένα σε αιθυλική αλκοόλη 95<sup>ο</sup>), από τα οποία προέρχονται τα υδατικά με αρραίωση

# Χημεία χρωστικών

- Είναι παράγωγα της πίσσας
- Χημικώς αποτελούνται από 2 ή περισσότερους δακτύλιους βενζενίου που συνδέονται με χρωμοφόρα
- Χρωμοφόρα= χημικοί δεσμοί που σχετίζονται με την παραγωγή χρώματος ( $C=C$ ,  $C=O$ ,  $C=S$ ,  $C=N$ )
- Η ένταση του χρώματος σχετίζεται με τον αριθμό των χρωμοφόρων

# Χημεία χρωστικών



- Αντικατάσταση
- $H^+$  με  $CH_3^-$  → χρωστικές τολουενίου
- $H^+$  με  $OH^-$  → » » φαινόλης
- $H^+$  με  $NH_2^-$  → » » ανιλίνης

# Χρωστικές της ανιλίνης

- Βασικές:

Χρωματίνη του πυρήνα

κυανούν του μεθυλενίου  
κρυσταλλικό ιώδες  
κυανούν της τολουιδίνης  
ιώδες γεντιανής  
πράσινο μαλαχίτη  
σαφρανίνη  
θειονίνη  
βασική φουξίνη

- Όξινες:

κυανούν μεθυλίου  
όξινη φουξίνη  
ηωσίνη

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ

- Ουδέτερες: Romanowsky

& για παράσιτα αίματος

(ηωσίνη & κυαν μεθυλεν)  
Giemsa  
(ηωσίνη & κρυσταλλικό ιώδες)

Τα περισσότερα μικρόβια χρωματίζονται με τις βασικές χρωστικές της ανιλίνης, διότι περιέχουν μεγάλο ποσό ριβονουκλεϊνικών οξέων και διότι το ισοηλεκτρικό σημείο της επιφάνειάς τους βρίσκεται στην όξινη περιοχή

συνδυασμοί όξινων & βασικών αν μας ενδιαφέρει τόσο η δομή του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματος

# Χρώσεις στην Μικροβιολογία

- **Αρνητικές** [γίνονται με διαλύματα σινικής μελάνης ή νιγροσίνης]

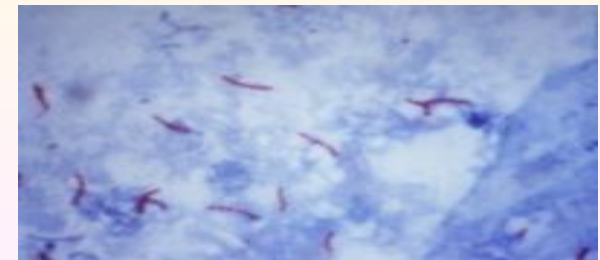
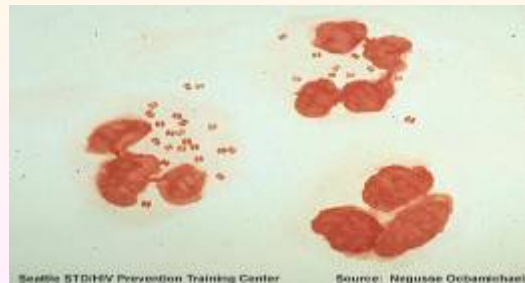
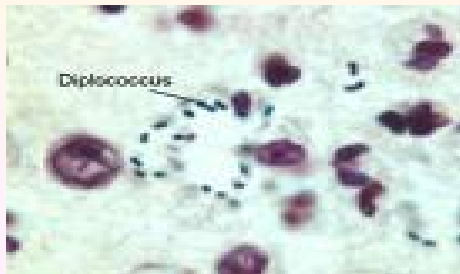
Χρωματίζεται το περιβάλλον του μικροβίου ενώ το κύτταρο παραμένει άχρωμο



- **Θετικές**

Χρωματίζονται τα κύτταρα των μικροβίων

- Απλές π. χ. κυανούν του μεθυλενίου
- Σύνθετες π. χ. Gram, Zielh - Nielsen



# Σύνθετες χρώσεις στην Μικροβιολογία

## ● ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΧΡΩΣΕΩΝ

- Προετοιμασία του παρασκευάσματος σε γυάλινη πλάκα
- Αποξήρανση
- Μονιμοποίηση [προσκόλληση πάνω στην πλάκα]
- *(ελαφρά θέρμανση, αιθανόλη, μεθανόλη\*, φορμαλδεύδη, πικρικό οξύ)*
- Χρώση (μερικές απαιτούν τη χρήση στυπτικού π.χ. Lugol)
- Αποχρωματισμός (αιθανόλη, ακετόνη)
- Χρώση με αντιθέτου χρώματος χρωστική

- Η μονιμοποίηση με μεθανόλη είναι πλεονεκτική στη διατήρηση των εμόρφων στοιχείων & εξασφαλίζει καθαρό background



# Συνήθεις σύνθετες χρώσεις στην Μικροβιολογία

- Χρώση κατά Gram
- Χρώση κατά Zielh - Neelsen

# Χρώση κατά Gram

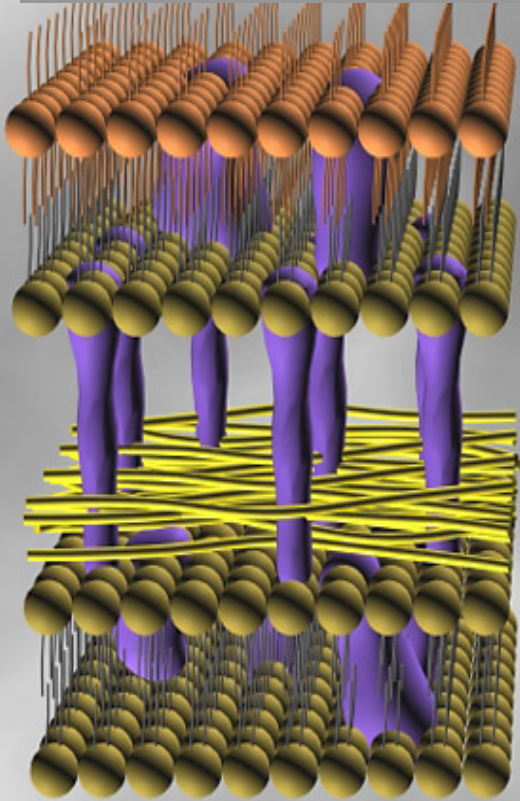


Hans Christian Gram (1853 – 1938)

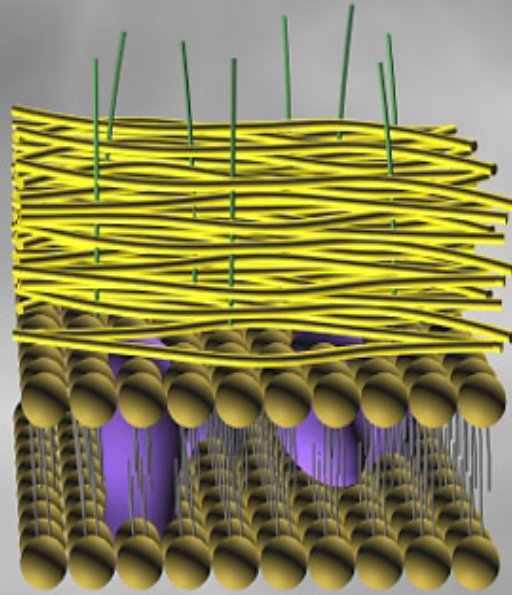
- Εμπειρική μέθοδος
- Επινοήθηκε το 1884
- Έχει υποστεί τροποποιήσεις
- Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη
- Μεγάλη χρησιμότητα για βιολογικά υλικά και ιστούς (ΕΝΥ, αρθρ)
- Σε υποψία φλεγμονής ταχύ αποτέλεσμα για την θεραπεία του ασθενή)
- Πολλές απόψεις για τη  $\pm$  συμπεριφορά των μικροβίων

# Χρώση κατά Gram

Gram αρνητικά



Gram θετικά



Η διαφορετική σύσταση του ΚΤ των μικροβίων ρυθμίζει τη διαπερατότητα στους οργανικούς διαλύτες.

Gram (+): ελατωμένη διαπερατότης - **ιώδη**

Gram (-): αυξημένη διαπερατότης - **κόκκινα**

# Κλινικά δείγματα για χρώση κατά Gram

## Δείγματα σε βαβακοφόρο στυλεό

- προτιμάται ένας επί πλέον στυλεός
- Σε περίπτωση ενός μόνο στυλεού τον τοποθετούμε σε αποστειρωμένο σωληνάριο με μικρή ποσότητα ΦΟ → ξεπλένουμε τον στυλεό, απόρριψη περίσσειας υγρού → επίστρωση σε πλάκα & καλλιέργεια

## Δείγματα όχι σε στυλεό (παρακεντήσεις, εξιδρώματα, πτύελα, κόπρανα)

- σύριγγα μεταφορά σε σωληνάριο & Vortex → επιλογή πυώδους ή αιματηρού δείγματος (ενδεχομένως αραιώση πυκνών δειγμάτων) → άπλωμα σε λεπτή στιβάδα

## ΕΝΥ ή δείγματα για φυγοκέντρηση

- χρήση κυτταροφυγοκέντρου αυξάνει την ευαισθησία
- μετά τη φυγοκέντρηση σε κλασική φυγόκεντρο συμπύκνωση σε 0.5 ml → παραλαβή του ιζήματος & τοποθέτηση σταγόνας που αφήνουμε να στεγνώσει

# Κλινικά δείγματα για χρώση κατά Gram

## Ούρα

- δεν φυγοκεντρούμε
- αναμιγνύουμε καλά το δείγμα
- ξήρανση της σταγόνας στον αέρα

## Αποξηραμένα δείγματα ή πολύ μικρή ποσότητα

- Εναιώρηση σε 0.5 ml ΦΟ → vortex → λεπτή επίστρωση

## Υλικό βιοψίας ή τεμάχιο ιστού

- αποτυπώματα
- τεμαχισμός ιστού → ομογενοποίηση → επίστρωση

## Καλλιέργημα σε υγρό θρεπτικό υλικό 1-2 σταγόνες επιστρώνονται

## Αποικίες από στερεό θρεπτικό υλικό

- εναιώρηση από μία αποικία σε μία σταγόνα ΦΟ (με πολύ επιμέλεια)

Επίστρωση: τόσο αραιή ώστε να βλέπουμε στοιχεία & τόσο πυκνή ώστε να φαίνεται η μορφολογία τους

# Τεχνική χρώσης κατά Gram

- Υδατικό διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους ( 1' )
- Ξέπλυμα με  $H_2O$  απεσταγμένο
- Διάλυμα ιωδίου (Lugol) ( 1' )
- Ξέπλυμα με  $H_2O$
- Αποχρωματισμός με οινόπνευμα:ακετόνη 1:1 ( <math><10''</math> )
- Ξέπλυμα με  $H_2O$
- Μεταχρωματισμός με υδατικό διάλυμα σαφρανίνης ( 1' )
- Ξέπλυμα με  $H_2O$
- Στέγνωμα
- Μικροσκόπηση (x 100 με καταδυτικό φακό)
- Σημαντική η παρατήρηση πολλών οπτικών πεδίων (> 20)



# Εκτιμήσεις με τη χρώση κατά Gram

- **Αρχικά X10 → εκτίμηση ποιότητας παρασκευάσματος**
  - Τα λευκοκύτταρα πρέπει να είναι βαμμένα κόκκινα
  - Βελόνες crystal violet δεν είναι Gram (+) βακτηρίδια
  - Παρατήρηση εκεί που υπάρχει μία στιβάδα
- **Καταλληλότητα δείγματος για καλλιέργεια**
  - Ανεύρεση πολλών επιθηλίων σε ούρα, πτύελα → ακατάλληλο
- **Παρουσία πυοσφαιρίων**
  - Λοίμωξη ↔ αποικισμός
- **Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου**
  - 1 μικρ/σμός/οπτικό πεδίο (X1000) σε αφυγοκέντρητα ούρα ~  $10^5$  /ml σε καλλιέργεια

# Απάντηση μικροσκόπησης

- **Περιγραφική ως προς την μορφολογία**
- Gram (+) κόκκοι: σε ζευγάρια, σε αλυσίδες, σε αθροίσματα,
- Gram (+) κοκκοβακτηρίδια, βάκιλοι, βακτηρίδια κορυνόμορφα σε σχηματισμούς L ή V ή κινέζικα γράμματα
- Gram (-) διπλόκοκκοι, βακτηρίδια, βακτηρίδια νηματοειδή, κοκκοβακτηρίδια με πολυμορφισμό
- Βλαστοκύτταρα με εκβλαστήσεις +/- υφές
  
- **Ημιποσοτική ως προς τον αριθμό**
- σπάνια:  $< 1 \mu / \text{ΟΠ}$
- λίγα:  $1 - 5 \mu / \text{ΟΠ}$
- αρκετά:  $5 - 10 \mu / \text{ΟΠ}$
- πολλά:  $> 10 \mu / \text{ΟΠ}$

Στην απάντηση της μικροσκόπησης δεν δίνουμε τους μικροοργανισμούς με το είδος και γένος αλλά μόνο περιγραφικά



# Ευαισθησία & ειδικότητα της χρώσης κατά Gram

## ➤ Τα χαρακτηριστικά των μικροβίων επηρεάζονται από :

- ηλικία καλλιεργήματος
- καλλιεργητικό υλικό
- ατμόσφαιρα επώασης
- παρουσία ανασταλτικών παραγόντων
- παρουσία φαγοκυττάρων

## ➤ Gram ποικίλλοι (variable) μικροοργανισμοί:

*Actinomyces, Arthobacter, Corynebacterium, Mycobacterium, Propionobacterium Bacillus, Butyrivibrio, Clostridium spp*

## ➤ Δύκολα χρωματιζόμενοι μικροοργανισμοί:

*Mycoplasma spp*

*Borellia spp*

## ➤ Μη χρωματιζόμενοι μικροοργανισμοί

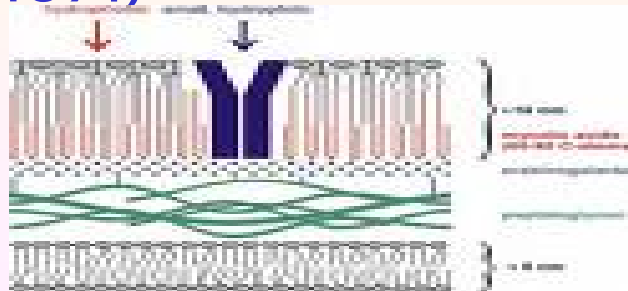
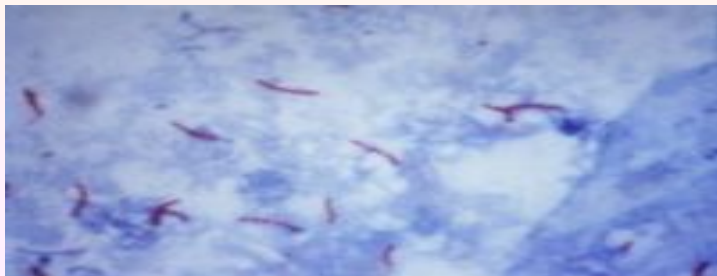
*Treponema palidum*

# Quality Control

- **Καθημερινός έλεγχος της εμφάνισης των αντιδραστηρίων**
  - ιζήματα του crystal violet → διήθηση
  - επιμόλυνση safranin → απόρριψη
  - Εξάτμιση (επηρεάζει τα αποτελέσματα) → συχνή αλλαγή
- **Έλεγχος αποτελεσματικότητας**
  - παρασκεύασμα μικτό με *E. coli* & *Staphylococcus* spp
  - παρασκεύασμα επιχρίσματος από περιοχή μεταξύ των δοντιών
- **Συχνές αιτίες κακής αποτελεσματικότητας Gram**
  - πλακάκια βρώμικα ή με λιπαρά στοιχεία → πλύσιμο με οινόπνευμα
  - πολύ παχύ παρασκεύασμα
  - υπερθέρμανση κατά τη μονιμοποίηση
  - παρατεταμένος αποχρωματισμός

# Χρώση κατά Ziehl - Neelsen

- Χρώση για οξεάντοχους μικροοργανισμούς (*Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, ωκύσταις *Cryptosporidium* & *Isospora belli*)
- Οξεαντοχή= φυσική ιδιότητα μερικών μικροοργανισμών που αναφέρεται στην ανθεκτικότητά τους να μην αποχρωματίζονται κατά τη διαδικασία της χρώσης κατόπιν επεξεργασίας με οξέα
- Επινοήθηκε το 1882 από τους Franz Ziehl (1859 -1926) και Friedrich Neelsen (1854 - 1894)

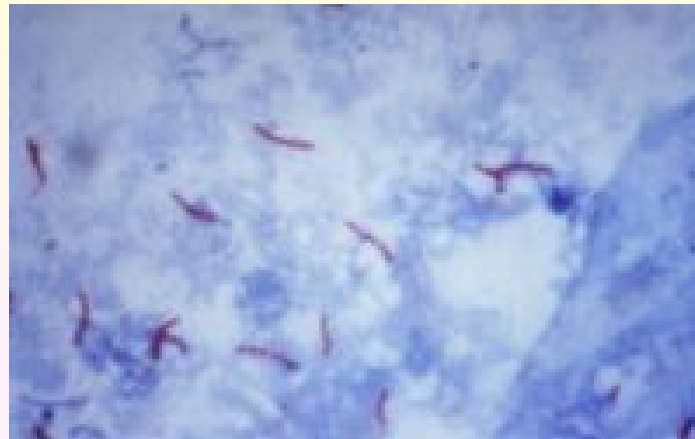
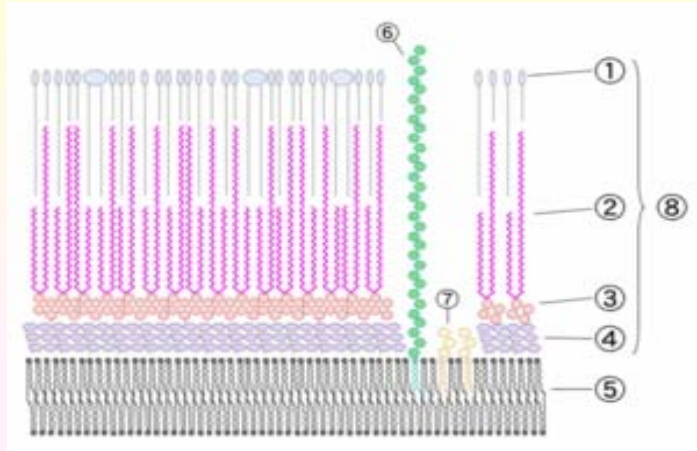


# Οξεάντοχοι μικροοργανισμοί

- *Mycobacterium* spp, (δηλ *M. tuberculosis* και τα άτυπα Μυκοβακτηρίδια, καθώς και το *M. leprae*)
- *Actinomyces* spp
- *Nocardia* spp
- Μερικοί μικροβιακοί σπόροι
- Οι ωκύστες *Cryptosporidium parvum*
- Κύστες των *Cyclospora* & του *Isospora belli*

# Μηχανισμός χρώσης κατά Zielh - Neelsen

- Η υψηλή περιεκτικότητα του ΚΤ ορισμένων μικροβίων σε μυκολικό οξύ. (Υδροξυμεθοξυοξύ υψηλού ΜΒ)
- Όταν η ουσία αυτή χρωματισθεί εν θερμώ με μία ισχυρή βασική χρωστική (φαινικούχος φουξίνη) σχηματίζει ένωση που δεν αποχρωματίζεται με οξέα



# Τεχνική χρώσης κατά Zielh - Neelsen

- Μονιμοποίηση παρασκευάσματος με μεθανόλη
- Κάλυψη παρασκευάσματος με πυκνή φαινικούχο φουξίνη
- Θέρμανση της κάτω επιφάνειας του παρασκευ-άσματος με φλόγα μέχρι να εμφανιστούν ατμοί. (5')
- Έκπλυση με νερό
- Αποχρωματισμός με οξυνισμένο οινόπνευμα
- Έκπλυση με νερό
- Μεταχρωματισμός με κυανούν του μεθυλενίου (30 - 60'')
- Έκπλυση με νερό
- Μικροσκόπηση

Για τη μικροσκόπηση της Z-N απαιτούνται τουλάχιστον 30'  
(60 - 90 οπτικά πεδία)

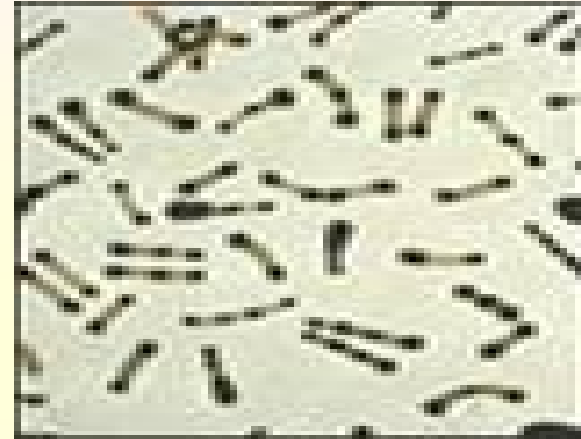
# Άλλες οξεάντοχες χρώσεις

- Τροποποιημένη Z-N
- Αποχρωματισμός με  $H_2SO_4$  οξύ 2 -3 %
- Κατά Kinyoun
- Ιδιαίτερο διάλυμα φαινικούχου φουξίνης
- Όχι θέρμανση
- Αποχρωματισμός με  $H_2SO_4$  οξύ 1 %

# Άλλες ειδικές χρώσεις

## ➤ Για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία κορυνοβακτηριδίων

- Χρώση κατά Albert
- Χρώση κατά Stoltenberg
- Χρώση κατά Neisser\*



## ➤ Για τις βλεφαρίδες

- Χρώση κατά Leifson
- Χρώση κατά Rhodes

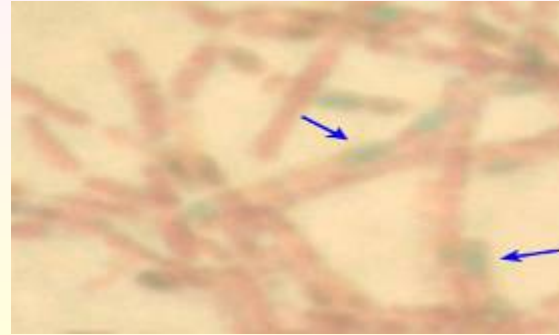




# Άλλες ειδικές χρώσεις

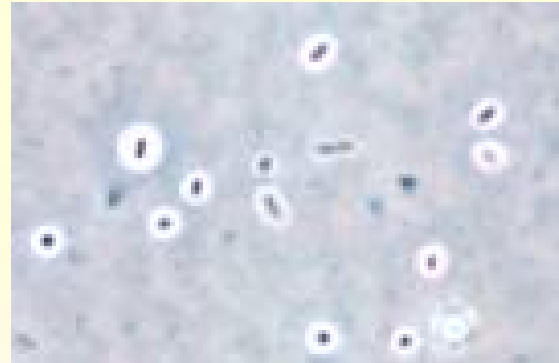
## ➤ Για τους σπόρους

- Χρώση κατά Witz - Conclin
- Χρώση κατά Moeller\*
- 



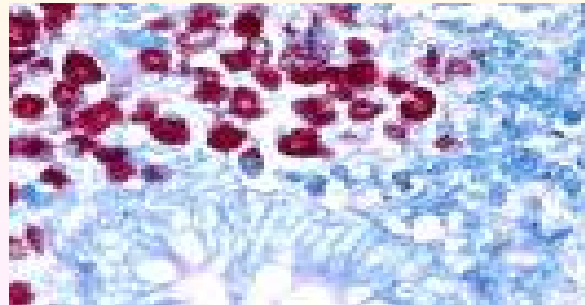
## ➤ Για το έλυτρο

- Χρώση κατά Muir
- Χρώση κατά Hiss



## ➤ Για κοκκία λίπους

- Χρώση με Sudan black B



# Άλλες ειδικές χρώσεις μικροοργανισμών

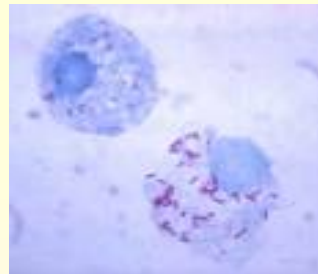
## ➤ Για το Τρεπόνημα το ωχρό

- Χρώση με εναμμόνιο νιτρικό άργυρο κατά Fontana (Θετική χρώση)
- Χρώση με σινική μελάνη (αρνητική χρώση)



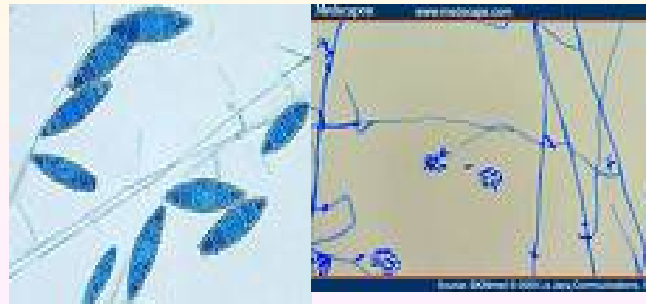
## • Για τις ρικότσιες

- Χρώση κατά Castaneda
- Χρώση κατά Machiavello



## ➤ Για τους μύκητες

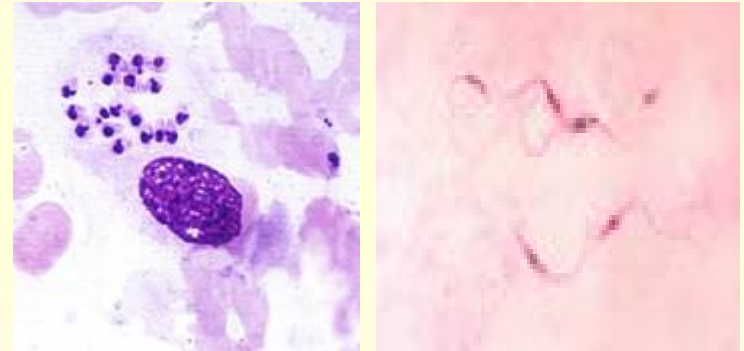
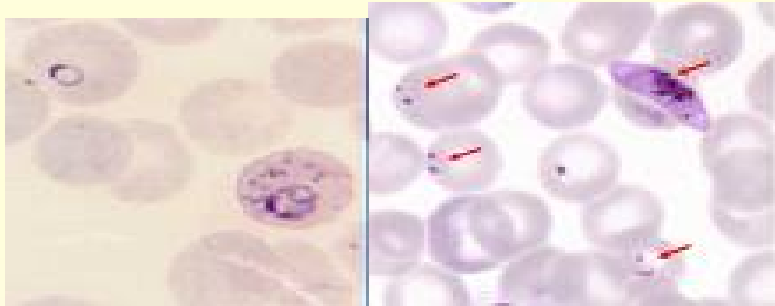
- Χρώση λακτοφαινόλης
- Χρώση με σινική μελάνη



# Άλλες ειδικές χρώσεις μικροοργανισμών

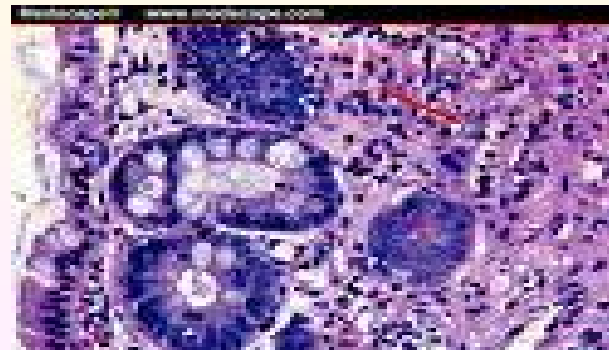
## ➤ Για πλασμώδια, λεισμάνιες, τρυπανοσώματα

- Χρώση Giemsa ή Romanowski



## ➤ Για κυτταρικά ή ενδοπυρηνικά έγκλειστα ιών

- Χρώση Giemsa



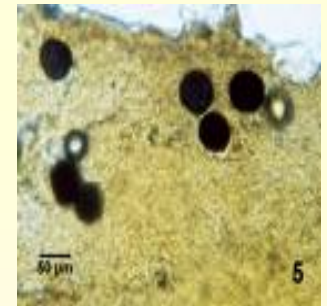
# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος βιολογικών υγρών

- Μέσω αυτής γίνεται ορατή
  - η παρουσία μικροοργανισμών
  - η μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών
  - διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά

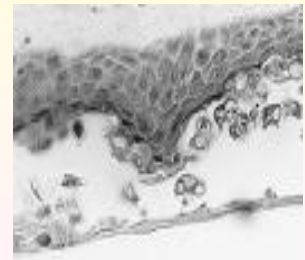
# Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος βιολογικών υγρών

- Νωπό παρασκεύασμα με NaCl 0.85 %
  - Βιολογική δραστικότητα (κίνηση, μορφολογία)
  - Ορολογική δραστικότητα σε ειδικούς αντιορούς

- Νωπό παρασκεύασμα με διάλυμα Lugol
  - Πρωτόζωα ή ωάρια ελμίνθων σε παρασιτολογική
  - Κοκκία αμύλου σε λειτουργική κοπράνων



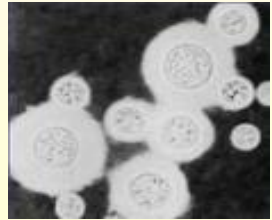
- Νωπό παρασκεύασμα με διάλυμα KOH 10 %
  - Στοιχεία μυκήτων σε ξέσματα δέρματος, ονύχων ή τρίχες



# Τεχνικές μικροσκοπικής εξέτασης νωπού παρασκευάσματος βιολογικών υγρών

## ➤ Νωπό παρασκεύασμα με σινική μελάνη ή νιγροσίνη

- Ελυτροφόροι μικροοργανισμοί/*Cryptococcus neoformans*



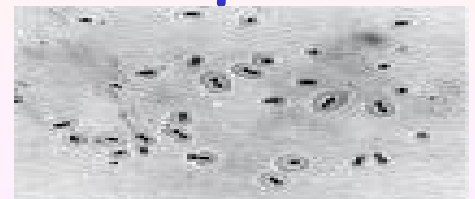
## ➤ Νωπό παρασκεύασμα σε σκοτεινό οπτικό πεδίο

- *Treponema pallidum* (Δεν δρά πολύ έντονα το φως γι'αυτό λέγεται ωχρά)



## ➤ Νωπό παρασκεύασμα σε αντίδραση quellung (Neufeld's)

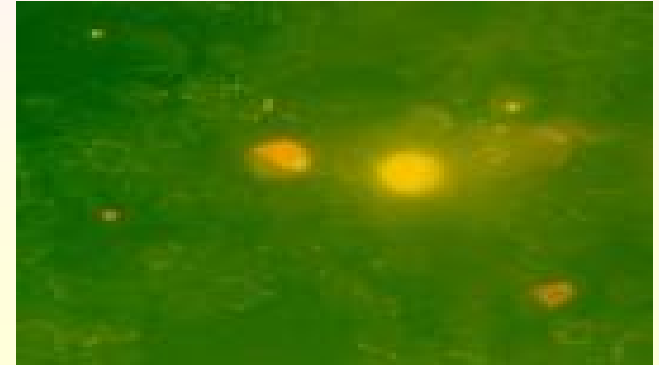
- Εξοίδηση ελύτρου με ορό που περιέχει ομόλογο αντικαψιδικό αντίσωμα. (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*)



# Φθορίζουσα χρώση

## ➤ Acridine Orange

(απαιτείται μικροσκόπιο φθορισμού)



- Διαπερατή στο ΚΤ
- Αντιδρά με το DNA & RNA δια παρεμβολής ή ηλεκτροστατικής προσέλκυσης
- Από  $10^3$  –  $10^4$  μικροοργανισμούς /ml
- Για να δούμε άμεσο παρασκεύασμα από βιολογικά υγρά όπου το μικροβιακό φορτίο μπορεί να είναι χαμηλό ή σε περιπτώσεις όπου οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι εγκλωβισμένοι μέσα σε στρώμα κατεστραμμένων ιστών

# In vitro – In vivo χρώσεις

## ➤ In vivo χρώσεις (Έμβριες χρώσεις)

- χρώσεις ζώντων μικροβίων ή ιστών

(σε πολύ αραιά διαλύματα χρωστικών 1/5000 – 1/500.000)

## ➤ In vitro χρώσεις (Ξηρές χρώσεις)

- χρώσεις ξηρών παρασκευασμάτων όπου οι μικρ/μοί ή οι ιστοί δεν είναι πλέον ζωντανοί

-----