



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Βασική αρχή η διατήρηση άσηπτων συνθηκών για τα διαλύματα και τα θρεπτικά μέσα που θα χρησιμοποιηθούν

Αποστείρωση: Ολική απαλλαγή από μικροοργανισμούς και σπόρια (χημικές ουσίες, θέρμανση, ακτινοβολία).

Απολύμανση: Καταστροφή ή μη αντιστρέψιμη αδρανοποίηση των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, αλλά όχι απαραίτητα και των σπορίων

Αντισηψία: Χημικά μικροβιοκτόνα για εφαρμογή σε ζωντανούς ιστούς

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Αποστείρωση

Αποστείρωση: Χρησιμοποιείται για την θανάτωση όλων των μικροοργανισμών (βακτήρια, ιοί, μύκητες, ιοειδή) καθώς και των σπορίων, επιτυγχάνεται μέσω:

- Υγρή θέρμανση ή με ατμό υπό πίεση (αυτόκαυστο) \longrightarrow 121°C, 1h, 15 psi.
- Ξηρή θέρμανση \longrightarrow 171°C, 1h / 160°C, 2h / 121°C, 16h.
- Διαλύματα \longrightarrow γλουταραλδεΐδη, υπεροξείδιο του υδρογόνου (3% έως 30%), φορμαλδεΐδη (6% έως 8%), διοξείδιο του χλωρίου.



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Απολύμανση

Απολύμανση: Χρησιμοποιείται για τη καταστροφή ή τη μη αντιστρέψιμη αδρανοποίηση των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, αλλά όχι απαραίτητα και των σπορίων, επιτυγχάνεται μέσω:

- ✓ Υγρή θέρμανση → 75°C έως 100°C.
- ✓ Διαλύματα: γλουταραλδεΐδη (η εισπνοή της μπορεί να επιδεινώσει το άσθμα), υπεροξειδίο του υδρογόνου (3% έως 6%), φορμαλδεΐδη (1% έως 8%), ενώσεις χλωρίου, 70% ισοπροπυλική αλκοόλη.
- ✓ Οικιακά υγρά απολυμαντικά (υποχλωριώδες νάτριο) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως απολυμαντικά ενδιάμεσης δράσης και έχουν βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο, ιοκτόνο και φυματοκτόνο δράση.
- ✓ Οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου όπως το χλωριούχο βενζαλκόνιο είναι αποτελεσματικές ως απολυμαντικά ήπιας δράσης όταν βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση. Τα νεότερα σκευάσματα είναι πολύ αποτελεσματικά απολυμαντικά με γρήγορη δράση ενάντια σε βακτήρια, ιούς, μύκητες και μυκοβακτηρίδια.

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Αντισηψία

Αντισηψία: Χημικά μικροβιοκτόνα για το δέρμα και τους ιστούς που δεν αντικαθιστούν, όμως τα απολυμαντικά.

- ✓ Αλκοόλες: 70% αιθυλική ή ισοπροπυλική αλκοόλη. Παρουσιάζουν ταχεία δράση ευρέος φάσματος κατά των μικροοργανισμών, αλλά όχι ενάντια στα σπόρια.
- ✓ Ιωδιοφόρα: ιώδιο σε συνδυασμό με ένα οργανικό μόριο-φορέα (povidone-iodine, poloxamer-iodine, τόσο σε αντισηπτικά όσο και σε απολυμαντικά).
- ✓ Hexachlorophene: βακτηριοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης αλλά μπορεί να είναι τοξικό.



Τρόποι αποστείρωσης

Μέθοδος	Διαδικασία	Χρήση	Μηχανισμός δράσης	Μειονεκτήματα
Ξηρή καύση	170° C για 1 ώρα σε κλίβανο	Γαλικά, μεταλλικά αντικείμενα	Οξειδώνει τα συστατικά των βακτηρίων	όχι για αποστείρωση θρεπτικών υλικών
Υγρή καύση	121° C υπό πίεση 28 psi επί 20-30 λεπτά σε αυτόκαυστο	Γαλικά, θρεπτικά υλικά, υγρά, στερεά	Συσσωματώνει τις πρωτεΐνες των μικρ/σμών	όχι θρεπτικά συστατικά (π.χ. λακτόζη) που δεν είναι σταθερά σε αυτές τις συνθήκες
Φιλτράρισμα	Μικροβιοκρατής ηθμός, αντλία κενού	Υγρά, θρεπτικά υλικά	Τα βακτήρια δεν διαπερνούν τους πόρους	Τα υαλικά πρέπει να έχουν αποστειρωθεί με άλλη μέθοδο
Τοξικά αέρια	Οξείδιο του αιθυλενίου υπό χαμηλή πίεση	Μεγάλες επιφάνειες, δωμάτια νοσοκομείων	Καταστρέφει κάθε μορφή ζωής (θανατηφόρος ατμόσφαιρα)	Εύφλεκτο, απομακρύνεται δύσκολα
Ακτινοβολία	Υπέριυθη (UV) ή ιονισμένη (ακτίνες γ και Χ)	Θρεπτικά υλικά, υγρά, στερεά	Προκαλεί μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των μικρ/σμών	Δεν διαπερνά εύκολα το γυαλί

Αποστείρωση

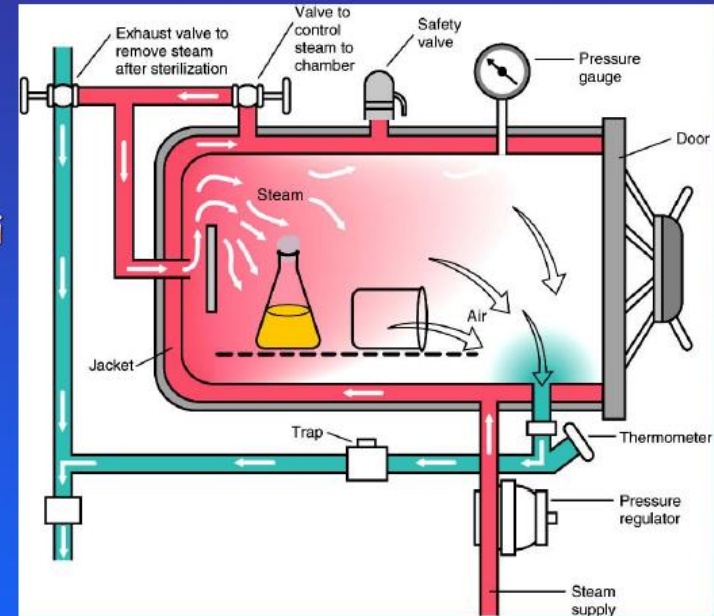
Αποστείρωση είναι η διαδικασία καταστροφής όλων των μορφών μικροβιακής ζωής σε ένα υλικό ή αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών μορφών (ενδοσπόρια)



Μέθοδος υγρής αποστείρωσης - Αυτόκαυστο

- Το αυτόκαυστο χρησιμοποιεί ατμό υπό πίεση
- Η αποστείρωση επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 15 psi σε 15 min

Pressure (psi in excess of atmospheric pressure)	Temperature (°C)
0 psi	100
5 psi	110
10 psi	116
15 psi	121
20 psi	126
30 psi	135



Μέθοδος ξηρής αποστείρωσης

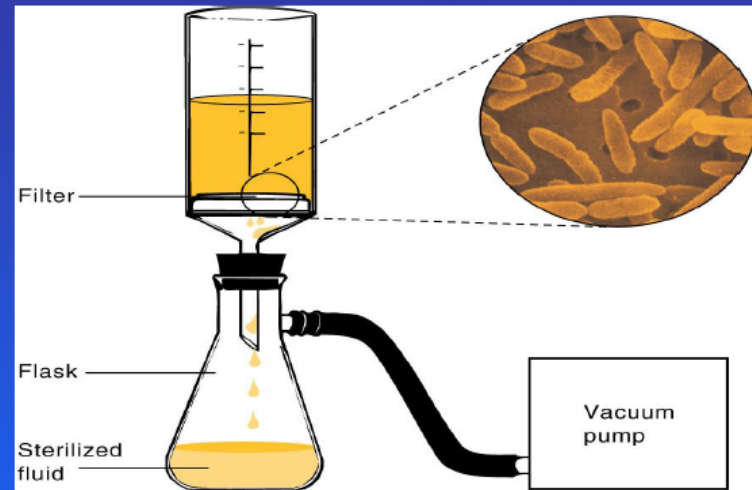
- Στη μέθοδο αυτή τα αντικείμενα τοποθετούνται σε φούρνο όπου διοχετεύεται θερμός και ξηρός αέρας.
- Η επεξεργασία γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 160-170°C για 2-4 ώρες.



Αποστείρωση με διήθηση

- Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση υγρών θρεπτικών υλικών που περιέχουν συστατικά ευαίσθητα στην θερμότητα (βιταμίνες, αντιβιοτικά, κλπ)

- Το υγρό θρεπτικό υλικό περνάει μέσα από ηθμό με μέγεθος πόρων $0,45 \mu\text{m}$ με τη βοήθεια κενού και συλλέγεται σε αποστειρωμένη φιάλη

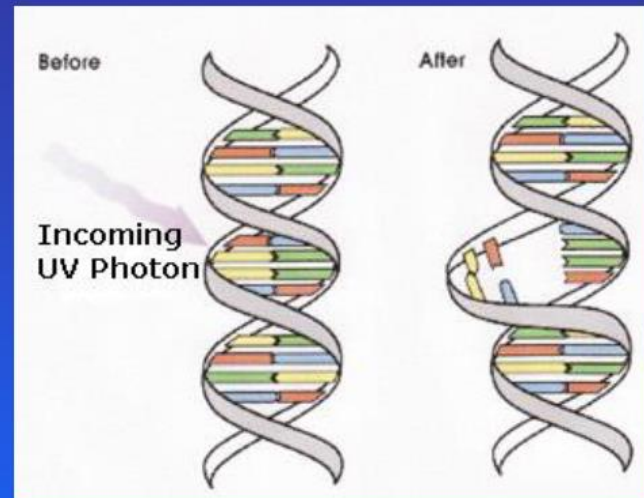


Αποστείρωση με ακτινοβολία

- Χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία (μη ιονίζουσα ακτινοβολία) με μήκος κύματος 260 nm. Επιδρούν στο DNA των βακτηρίων.

- Χρησιμοποιείται επίσης και ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες X, ακτίνες γ και καθοδικές ακτίνες).

- Παρουσιάζουν μικρή δεισδυτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση εργαστηριακών υλικών όπως τρυβλία, σύριγγες, μικροβιολογικοί κρίκοι.



Πειραματική διαδικασία



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

- Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται αμέσως μετά την ετοιμασία τους.
- Τα θρεπτικά υλικά ελέγχονται για μολύνσεις πριν τη χρήση.
- Δοχεία με θρεπτικό υλικό ή τρυβλία ανοίγονται πάντα κάτω από τη φλόγα λύχνου και δεν αφήνονται σε επαφή με τον αέρα.
- Στα πειράματα χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες πιπέτες και η αποστειρωμένη συσκευασία δεν ανοίγεται πριν το πείραμα.

**"Εκμάθηση μικροσκοπίου -
Χρώση και διαχωρισμός Gram+/Gram-
βακτηρίων."**

Ιστορική Αναδρομή

Για την επιστήμη της Βιολογίας, το μικροσκόπιο αποτέλεσε τη **μεγαλύτερη ίσως εφεύρεση**. Πριν την τελειοποίηση του μικροσκοπίου, η Βιολογία σαν επιστήμη έμεινε **στάσιμη** για πολλούς αιώνες, και οι βιολόγοι ανίκανοι να εξηγήσουν τα φαινόμενα της ζωής, οδηγήθηκαν πολλές φορές σε λάθος συμπεράσματα. Η ανικανότητα αυτή των βιολόγων οφειλόταν σε μία βασική αιτία: **την αδυναμία τους να δουν και να παρατηρήσουν** τη βασική μονάδα ζωής, το κύτταρο.

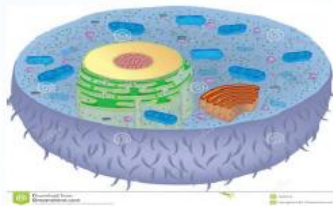


Γιατί ανακαλύφθηκε το μικροσκόπιο;

Η όραση του ανθρώπου του επιτρέπει να παρατηρεί λεπτομέρειες του κόσμου που τον περιβάλλει της τάξης των **0,2mm** όταν το αντικείμενο απέχει από τα μάτια του απόσταση **25cm**.

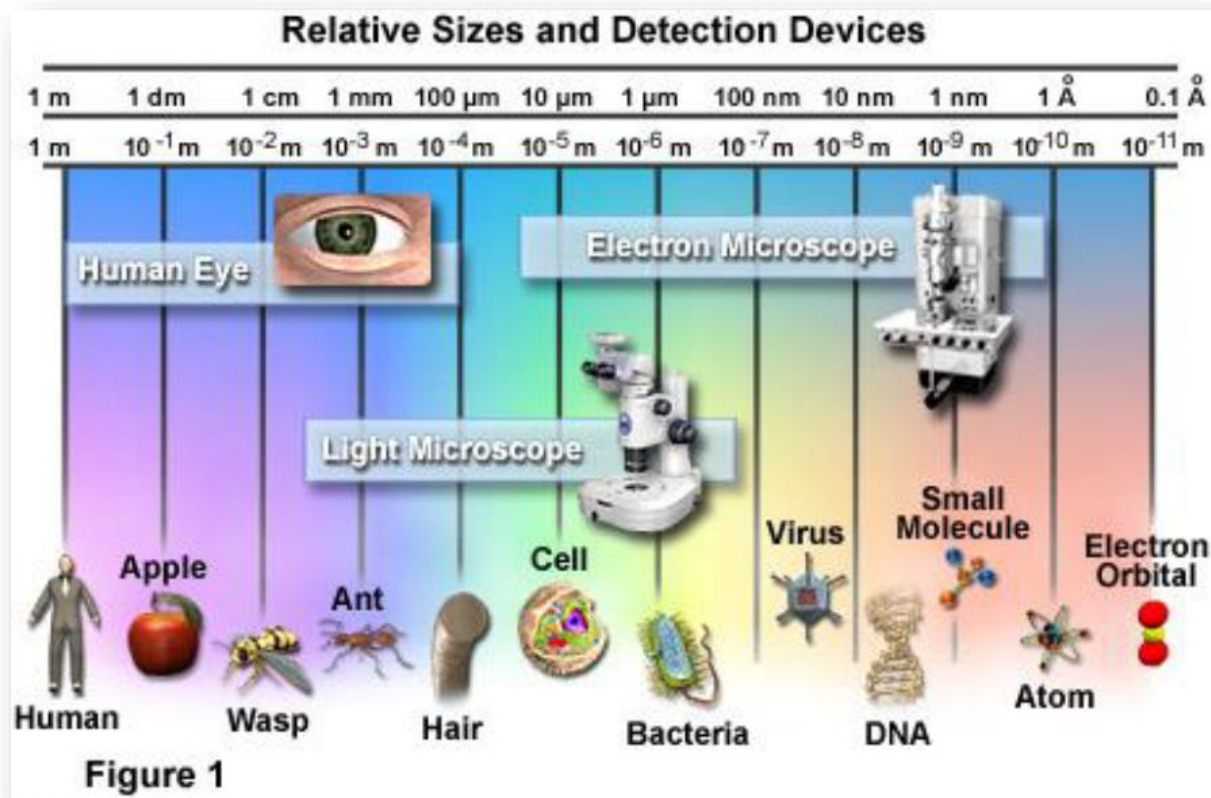


Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο έχει διάμετρο **10-20 μm**, είναι δηλαδή **10-20 φορές** μικρότερο από το πιο μικρό αντικείμενο που μπορεί να δει ο άνθρωπος.



Εκμάθηση μικροσκοπίου

Ο μικρόκοσμος



Μικροσκόπιο

Μικροσκόπιο είναι η διάταξη φακών με την οποία επιτυγχάνεται μεγέθυνση μικρών κυρίως, αντικειμένων. Εφευρέθηκε από τους Ολλανδούς αδελφούς Johan και Zaccharias Jansen, εμπόρους και ερασιτέχνες κατασκευαστές οπτικών, το 1590.



Επειδή το πιο σημαντικό τμήμα του σύνθετου μικροσκοπίου είναι το οπτικό σύστημα, δηλαδή ένα σύστημα από φακούς κατάλληλα διευθετημένους, οι ιδιότητες του οργάνου ταυτίζονται κατά κύριο λόγο με τις ιδιότητες των φακών που σχετίζονται με το φαινόμενο της διάθλασης του φωτός.

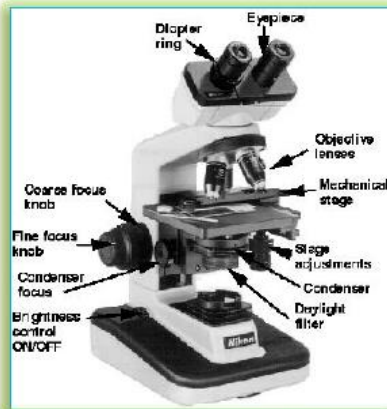
Οπτικά ή Φωτονικά Μικροσκόπια

Από την κατασκευή του πρώτου μικροσκοπίου έως σήμερα, η επιστήμη της μικροσκοπίας έχει κάνει μεγάλα άλματα, με την ανάπτυξη και τελειοποίηση διαφορετικών τεχνικών και τύπων μικροσκοπίων, όπως:

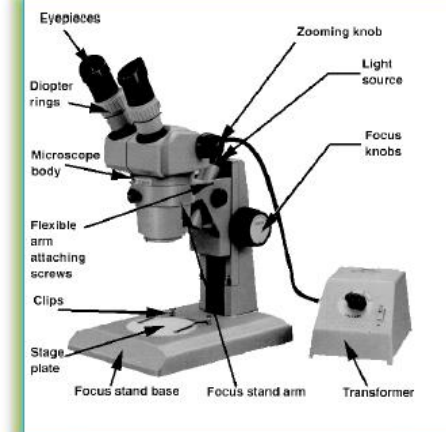
- το μικροσκόπιο **φωτεινού πεδίου**,
- το μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων,
- το μικροσκόπιο συμβολής,
- το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου,
- το πολωτικό μικροσκόπιο,
- το μικροσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας,
- το μικροσκόπιο φθορισμού και
- το ακουστικό μικροσκόπιο.

Τα μικροσκόπια αυτά ανήκουν όλα στην κατηγορία των οπτικών ή φωτονικών μικροσκοπίων. Ονομάζονται έτσι αφού χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 400 - 700 nm.

Εκμάθηση μικροσκοπίου



Σύνθετο φωτονικό (οπτικό)
μικροσκόπιο



Στερεοσκόπιο



Ηλεκτρονικό
μικροσκόπιο
διέλευσης

Ηλεκτρονικό
μικροσκόπιο
σάρωσης



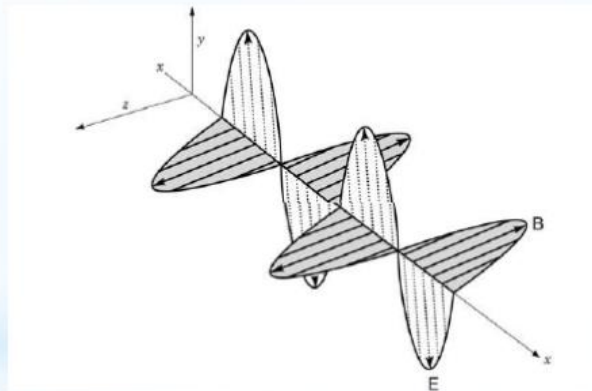
- **Οπτικά ή Φωτονικά Μικροσκόπια**

Τα φωτονικά μικροσκόπια χρησιμοποιούν **φωτόνια** και **γυάλινους φακούς**, Το πιο διαδεδομένο για συνήθη μικροσκοπική παρατήρηση και απλό στη χρήση του είναι το μικροσκόπιο **φωτεινού πεδίου**

- **Ηλεκτρονικά Μικροσκόπια**

Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια χρησιμοποιούν **ηλεκτρόνια** και **μαγνήτες**

Το φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

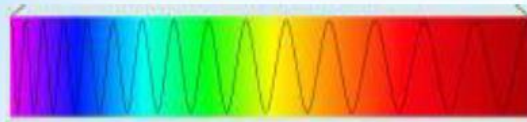


Κάθε κύμα απαρτίζεται από ένα ηλεκτρικό (E) και ένα μαγνητικό (B) πεδίο οι εντάσεις των οποίων αυξομειώνονται ακολουθώντας ημιτονοειδή καμπύλη σε χρόνο ή χώρο

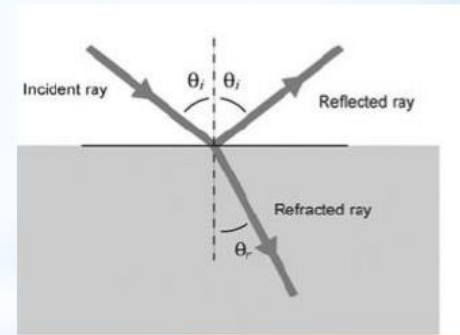
Μήκος κύματος φωτός (λ)

400 nm

700 nm



Εκτροπές ακτίνας φωτός



Διάθλαση (refraction): Ακτίνα φωτός η οποία προσπίπτει σε κάποιο υλικό, αλλάζει πορεία και διέρχεται μέσα από αυτό. Η γωνία διάθλασης εξαρτάται από το είδος του υλικού

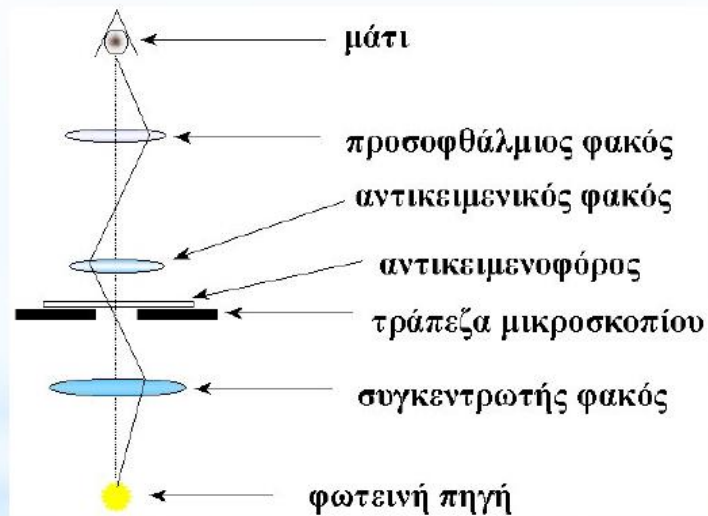
Τι σωματίδια μπορούν να παρατηρηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο;

Σε γενικές γραμμές, η ακτινοβολία ενός δεδομένου μήκους κύματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση δομών **μικρότερων από το ίδιο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας**.

Με βάση αυτό, το όριο της διακριτικής ικανότητας του οπτικού μικροσκοπίου καθορίζεται από το μήκος κύματος του ορατού φωτός, το οποίο κυμαίνεται από **400nm για το ιώδες έως 700nm** για το ερυθρό.

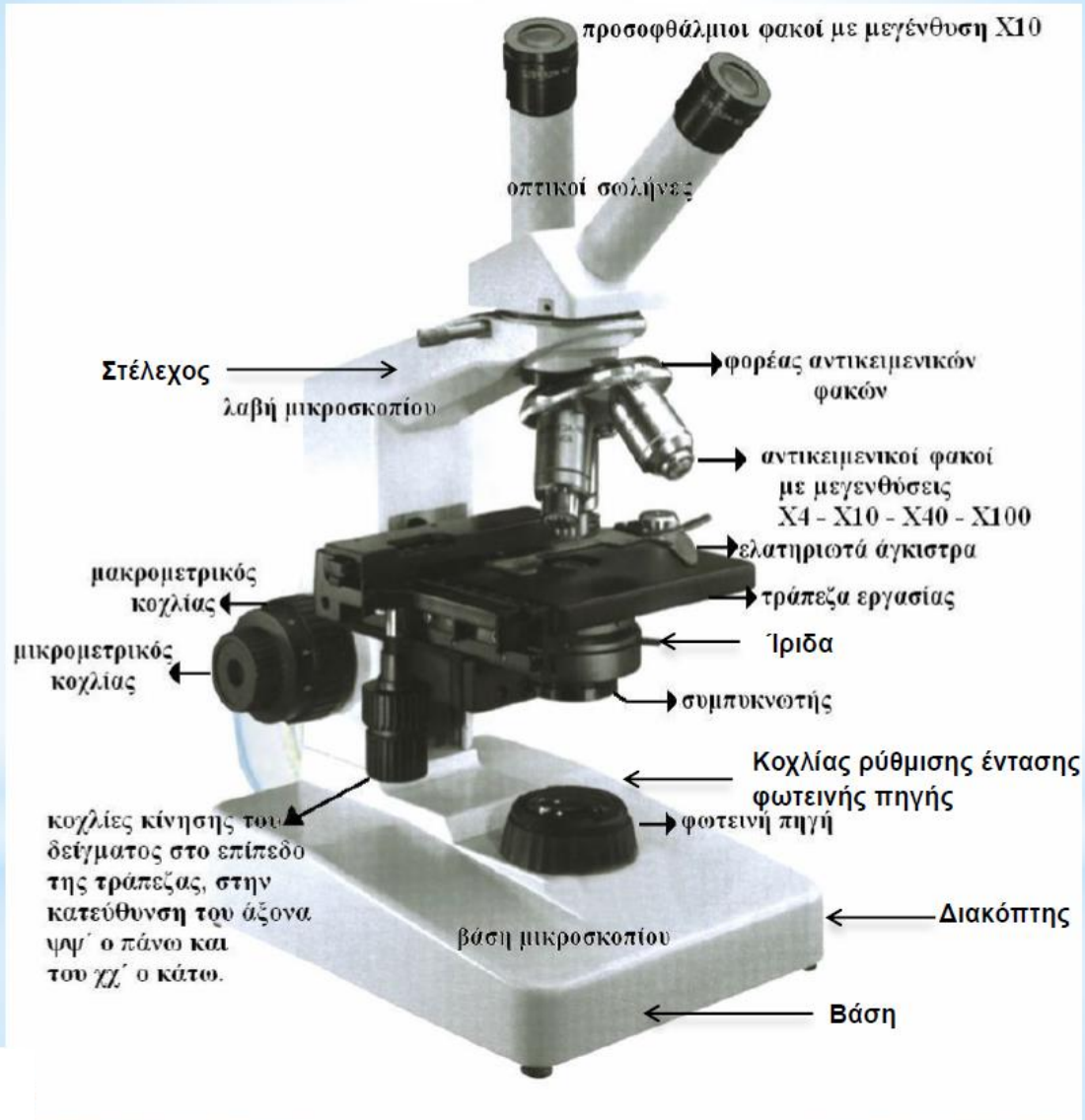
Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι τα βακτήρια και τα μιτοχόνδρια, με πλάτος 500nm περίπου είναι τα μικρότερα αντικείμενα που μπορούν να παρατηρηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο. Λεπτομέρειες μικρότερες από αυτές είναι **αδύνατον να γίνουν αντιληπτές** εξαιτίας των προβλημάτων που προκαλούνται από τη φύση των φωτεινών κυμάτων

Διάγραμμα των φακών και πορείας των φωτεινών ακτίνων στο οπτικό μικροσκόπιο



Το οπτικό τμήμα αποτελείται από δύο **συγκλίνοντα ομοαξονικά συστήματα φακών** που αποτελούν τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο φακό. Ο πρώτος έχει μικρή εστιακή απόσταση.

Η **αρχική μεγέθυνση** οφείλεται στον αντικειμενικό φακό. Το παραγόμενο είδωλο **μεγεθύνεται για δεύτερη φορά** από τον προσοφθάλμιο φακό.



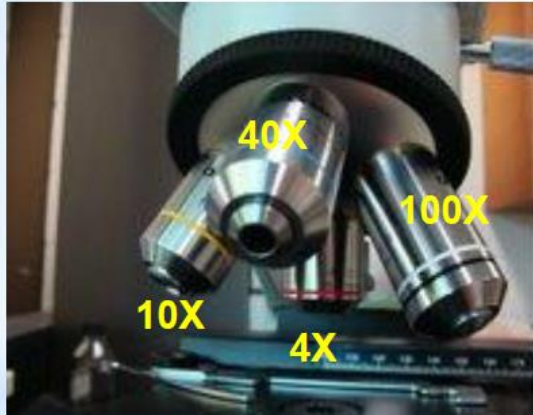
Αντικειμενικοί Φακοί

Μεγέθυνση ονομάζουμε τον λόγο του μεγέθους του ειδώλου προς το πραγματικό μέγεθος του αντικειμένου

Η **ολική μεγέθυνση** του μικροσκοπίου είναι ίση με τη μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού, πολλαπλασιαζόμενη με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού. Δηλαδή αν παρατηρούμε ένα παρασκεύασμα μέσω ενός αντικειμενικού φακού 40X και ενός προσοφθάλμιου 10X, τότε η ολική μεγέθυνση του παρατηρούμενου αντικειμένου είναι $10 \cdot 40 = 400$ φορές.

Οι αντικειμενικοί φακοί είναι **τα πιο σημαντικά εξαρτήματα** του συστήματος σχηματισμού εικόνας του μικροσκοπίου γιατί από αυτούς εξαρτάται η τελική διακριτική ικανότητα και η αρχική μεγέθυνση.

Αντικειμενικοί Φακοί



Ο φακοί αυτοί έχουν χαραγμένες στο σώμα τους **διάφορες ενδείξεις** π.χ. Plan 40/0.65 160/0.17, που σημαίνει φακός επίπεδος μεγέθυνσης 40X, αριθμητικό άνοιγμα 0.65, για χρήση σε μικροσκόπιο με σωλήνα μήκους 160 mm, και με καλυπτρίδα πάχους $0.17+0.01$ mm.

Διακριτική Ικανότητα Μικροσκοπίου

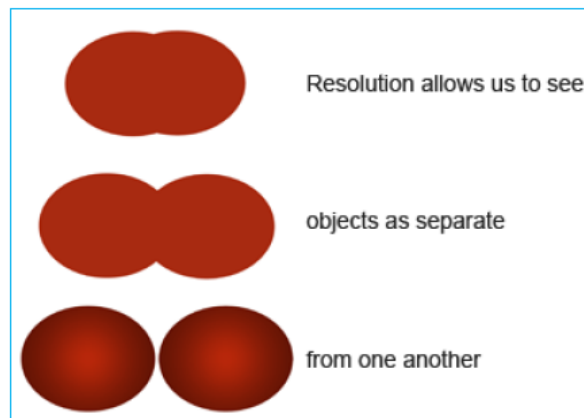
Διακριτική ικανότητα: η ικανότητα του μικροσκοπίου να διακρίνει ως χωριστά δύο σημεία πολύ γειτονικά και να μην τα «βλέπει» ως μια οντότητα. Η διακριτική ικανότητα ενός μικροσκοπίου αυξάνεται όταν περιορίζεται η εκτροπή των ακτίνων και το φως ακολουθεί μία ευθύγραμμη διαδρομή. Η διακριτική ικανότητα ενός μικροσκοπίου εκφράζεται με το διακριτικό όριο.

Διακριτικό όριο: η ελάχιστη απόσταση που μπορεί να υπάρχει ανάμεσα σε δύο σημεία ώστε αυτά να φαίνονται σα δύο ξεχωριστά σημεία και όχι σαν μία συγκεχυμένη εικόνα. Εξαρτάται κυρίως από τον αντικειμενικό φακό.

Αν ένα μικροσκόπιο έχει διακριτική ικανότητα $0,3\mu$, δύο αντικείμενα θεωρούνται **ξεχωριστά** αν χωρίζονται με μια απόσταση μεγαλύτερη ή ίση με $0,3\mu$. Αν όμως τα ίδια αντικείμενα εξετάζονται με ένα μικροσκόπιο που η διαχωριστική του ικανότητα είναι $0,5\mu$, τότε θα φαίνονται σ' ένα σημείο.

Εκμάθηση μικροσκοπίου

Διακριτική ικανότητα



Η **διακριτική ικανότητα** (resolving power) είναι η δυνατότητα του φακού να απεικονίσει δύο γειτονικά αντικείμενα ως διακριτές οντότητες.

Όταν ο φακός δεν έχει την ικανότητα αυτή, τα δύο αντικείμενα εμφανίζονται ως ένα και κατά συνέπεια **μειώνεται η ανάλυση**. Αύξηση της μεγέθυνσης δεν επιδιορθώνει την έλλειψη ανάλυσης και οδηγεί σε θολή απεικόνιση του δείγματος.

Διακριτική ή Διαχωριστική Ικανότητα μικροσκοπίου

Η **διακριτική ικανότητα** (d) ενός οπτικού συστήματος δίνεται από τον τύπο:

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{n \eta \mu \varphi}$$

0,61 ένας σταθερός αριθμός,

λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιούμε,

n ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ παρασκευάσματος και φακού και

φ το μισό της γωνίας του φωτεινού κώνου που δέχεται ο φακός.

Το γινόμενο $n \eta \mu \varphi$ λέγεται **αριθμητικό άνοιγμα (NA)** του φακού και εξαρτάται αποκλειστικά από τη κατασκευή του φακού. Εφ' όσον λοιπόν το φως που χρησιμοποιούν τα οπτικά μικροσκόπια συνήθως έχει ένα μέσο μήκος κύματος **$\lambda=500$ nm** και το αριθμητικό άνοιγμα ενός πολύ καλού φακού είναι **$NA=1,6$** τότε η διακριτική ικανότητα του οπτικού μικροσκοπίου δεν μπορεί να ξεπεράσει τα **$d=200$ nm = 0.2 μ m**

Ίριδα (διάφραγμα)

Το διάφραγμα είναι προσαρτημένο στον πυκνωτή και σχεδιάστηκε για την ρύθμιση του αριθμητικού ανοίγματος του και όχι για την λαμπρότητα του φωτισμού. Το άνοιγμα του διαφράγματος μπορεί να ρυθμιστεί έτσι ώστε **να ταιριάζει με το αριθμητικό άνοιγμα του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου αντικειμενικού φακού**, με σκοπό την βέλτιστη απόδοση του αντικειμενικού φακού, όπως το βάθος πεδίου, η αντίθεση και η διακριτική ικανότητα.

Όταν το παρασκεύασμα **δεν είναι χρωματισμένο**, μπορεί κανείς να αυξήσει την αντίθεση στην εικόνα ρυθμίζοντας το άνοιγμα του διαφράγματος (ίριδα). Η **ελάττωση της ποσότητας του φωτός αυξάνει την αντίθεση**.

Αντίθεση

Δεν αρκεί μόνο η **μεγέθυνση** και η **διακριτική ικανότητα** ενός μικροσκοπίου για να ξεχωρίσει π.χ. ένα κύτταρο από το περιβάλλον του ή να ξεχωρίσουν τα διάφορα τμήματά του κυττάρου. Πρέπει να υπάρχει και επαρκής **αντίθεση** μεταξύ τους.

Αντίθεση είναι η διαφορά στην ένταση του φωτός που αντιλαμβάνεται ο παρατηρητής μεταξύ των διάφορων σημείων μιας δομής, πχ. ενός κυττάρου

Η αντίθεση προκύπτει από τη διαφορετική απορρόφηση του φωτός από τα διάφορα τμήματα της δομής. Μερικά κύτταρα και κυτταρικές δομές μπορεί να περιέχουν φυσικές χρωστικές, όπως, π.χ., αιμοσφαιρίνη τα ερυθρά αιμοσφαίρια και χλωροφύλλη οι χλωροπλάστες

Όμως τα περισσότερα κύτταρα και κυτταρικές δομές είναι διαφανή, με αποτέλεσμα η αντίθεσή τους να είναι μικρή. Για να αυξηθεί η αντίθεση των κυτταρικών δομών, χρησιμοποιούνται συνήθως **χρωστικές** που δεσμεύονται από ορισμένες κυτταρικές δομές

Χρησιμοποιούνται όμως και κατάλληλα **έγχρωμα φίλτρα**

Όταν το παρασκεύασμα δεν είναι χρωματισμένο, μπορεί κανείς να αυξήσει την αντίθεση στην εικόνα **μειώνοντας το άνοιγμα του διαφράγματος** (ίριδα). Βέβαια, σύμφωνα με όσα προαναφέραμε, η διακριτική ικανότητα ελαττώνεται αλλά η αντίθεση και το βάθος του πεδίου αυξάνεται πολύ.

Συμπυκνωτής φακός

Αποτελείται από σύστημα φακών που έχουν σκοπό να **συγκεντρώσουν** από τη φωτεινή πηγή όσο γίνεται περισσότερες ακτίνες φωτός για να περνούν μέσα από το παρασκεύασμά μας.

Με άλλα λόγια, ο συμπυκνωτής που βρίσκεται κάτω από την τράπεζα **συγκεντρώνει το φως της ενσωματωμένης στη βάση του μικροσκοπίου φωτεινής πηγής** και το εστιάζει στο παρασκεύασμα.

Ένταση του φωτός

Η ένταση του φωτός είναι επίσης μια πολύ σημαντική παράμετρος στην διαμόρφωση της **ποιότητας** της εικόνας που επιτυγχάνετε

Υπάρχουν παρασκευάσματα που προκειμένου να παρατηρηθούν, απαιτείται **μεγάλης έντασης φωτισμός** (παρασκευάσματα τομών μεγάλου πάχους κλπ.)

Αντιθέτως υπάρχουν παρασκευάσματα στα οποία το φως δεν απορροφάται σημαντικά (πχ. διαφανή παρασκευάσματα). Εδώ προκειμένου να διακρίνουμε σχήματα και δομές **χαμηλώνουμε την ένταση του φωτισμού**

Γιατί το δείγμα μας στην καλυπτρίδα πρέπει να είναι βρεγμένο;

Η προϋπόθεση για την καλή λειτουργία του μικροσκοπίου, είναι η **ευθύγραμμη διαδρομή**, χωρίς εκτροπή, της φωτεινής δέσμης από κάποιο σημείο του αντικειμένου ως τον αντικειμενικό φακό. Αυτό σημαίνει ότι **ο συμπυκνωτής, το περιβάλλον του αντικειμένου και ο αντικειμενικός φακός έχουν περίπου τον ίδιο δείκτη διάθλασης**.

Όμως, σε κάθε παρασκευάσμα, ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και στην καλυπτρίδα **παρεμβάλλεται ένα λεπτό στρώμα αέρα με δείκτη διάθλασης $n=1$** που αυξάνει την εκτροπή των φωτεινών ακτίνων και δυσχεραίνει τη μικροσκοπική παρατήρηση και εξασθενεί το είδωλο.

Προς αποφυγή του παραπάνω προβλήματος τα αντικείμενα μικροσκόπησης παρατηρούνται μέσα σε σταγόνες νερού ή άλλου υγρού.

Γιατί χρησιμοποιούμε κεδρέλαιο;

Στην περίπτωση αντικειμενικών φακών μεγάλης ισχύος π.χ. με μεγέθυνση 100X, με μικρή εστιακή απόσταση και μικρή περιοχή οπτικού πεδίου χρησιμοποιείται υγρό καταδύσεως με μεγάλο δείκτη διαθλάσεως (συνήθως **κεδρέλαιο** που έχει δείκτη διαθλάσεως 1,5 ίδιον με τον δείκτη διαθλάσεως του αντικειμενικού φακού).

Αναλυτικότερα, όταν βυθίζουμε τον αντικειμενικό φακό μέσα στο διαφανές κεδρέλαιο που έχει τον ίδιο δείκτη διάθλασης με τον καταδυτικό φακό, οι ακτίνες φωτός που προέρχονται από **τη φωτεινή πηγή – διάφραγμα - συμπυκνωτή φακό**, εισέρχονται μέσα από το δείγμα μας και τη σταγόνα κεδρέλαιου, και εξέρχονται χωρίς να διαθλώνται, (εφόσον απουσιάζει το στρώμα του αέρα). Έτσι διαδίδονται ευθύγραμμα στον αντικειμενικό φακό οπότε διαθλώνται για πρώτη φορά όταν φτάσουν στην πίσω επιφάνεια του αντικειμενικού φακού.

Προβλήματα κατά τη μικροσκόπηση και πιθανές λύσεις

- **Δεν υπάρχει εικόνα, η εικόνα είναι πολύ σκοτεινή ή φωτίζεται ακανόνιστα**

Δεν έχει ανάψει το μικροσκόπιο

Δεν έχει ρυθμιστεί η ένταση της φωτεινής πηγής

Ο αντικειμενικός φακός δεν έχει έλθει στη θέση του

Το διάφραγμα είναι κλειστό

Η λάμπα δεν λειτουργεί

Η τράπεζα δεν είναι στη σωστή θέση και δεν περνάει το φως της φωτεινής πηγής από το παρασκεύασμα

- **Υπάρχει εικόνα και δυνατότητα εστίασης αλλά η εικόνα είναι αχνή και μη ευκρινής**

Το διάφραγμα πρέπει να κλείσει ακόμα περισσότερο

Ο συμπυκνωτής χρειάζεται ρύθμιση

Πρέπει να ρυθμιστούν ο αδρός και ο μικρομετρικός κοχλίας

- **Εικόνα που δεν μπορεί να εστιαστεί**

Η καλυπτρίδα έχει μεγάλο πάχος

Η αντικειμενοφόρος έχει τοποθετηθεί ανάποδα με το παρασκεύασμα προς τα κάτω

Η αντικειμενοφόρος δεν είναι τελείως επίπεδη

Οι προσοφθάλμιοι δεν έχουν ρυθμιστεί κατάλληλα για τα μάτια του παρατηρητή

Ο μικρομετρικός κοχλίας έχει φτάσει στα όριά του

- **Σκόνη και βρωμιά στο οπτικό πεδίο**

Οι προσοφθάλμιοι είναι βρώμικοι

Η αντικειμενοφόρος είναι βρώμικη

Η λάμπα ή ο συμπυκνωτής είναι βρώμικοι

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Ταυτοποίηση μικροοργανισμών:

Η αναγνώριση και η κατάταξη ενός μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο γένος, είδος και στέλεχος με μορφολογικά, βιοχημικά, γενετικά και αντιγονικά χαρακτηριστικά

Γένος

- Ομάδα διαφορετικών ειδών οργανισμών με πολλές ομοιότητες

Είδος Βασική μονάδα ταξινόμησης

- Ομάδα συγγενικών οργανισμών με πολλές ομοιότητες και κοινές λειτουργίες
- Οι οργανισμοί του ίδιου είδους εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στο γενετικό τους υλικό

Στέλεχος

- Σύνολο μικροβίων καθαρής καλλιέργειας (καλλιέργεια από μία μόνο αποικία)
- Στελέχη του ίδιου είδους που εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένα **υποείδος**

Στάδια ταυτοποίησης

Καλλιέργεια βιολογικού υλικού

Ανακαλλιέργεια για τη δημιουργία καθαρής καλλιέργειας

Μελετάται:

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης του μικροβίου (θερμοκρασία, οξυγόνο, υγρασία, χρόνος κ.λ.π)
2. Οι μορφολογία των αποικιών (μέγεθος, σχήμα, χρώμα κ.λ.π.)
3. Διαχωρισμός με χρώση Gram σε Gram(+) και Gram(-)
4. Βιοχημικές ιδιότητες μικροοργανισμού

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ



Καλλιέργεια μικροοργανισμών:

Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός μικροβίων σε θρεπτικά υλικά στο εργαστήριο

Θετική καλλιέργεια: Καλλιέργεια στην οποία έχουν αναπτυχθεί μικρόβια

Αρνητική καλλιέργεια: Καλλιέργεια στην οποία ο αριθμός των μικροβίων που έχει αναπτυχθεί είναι πολύ μικρός και δεν αξιολογείται

Στείρα καλλιέργεια: Καλλιέργεια στην οποία δεν έχει αναπτυχθεί κανένα μικρόβιο

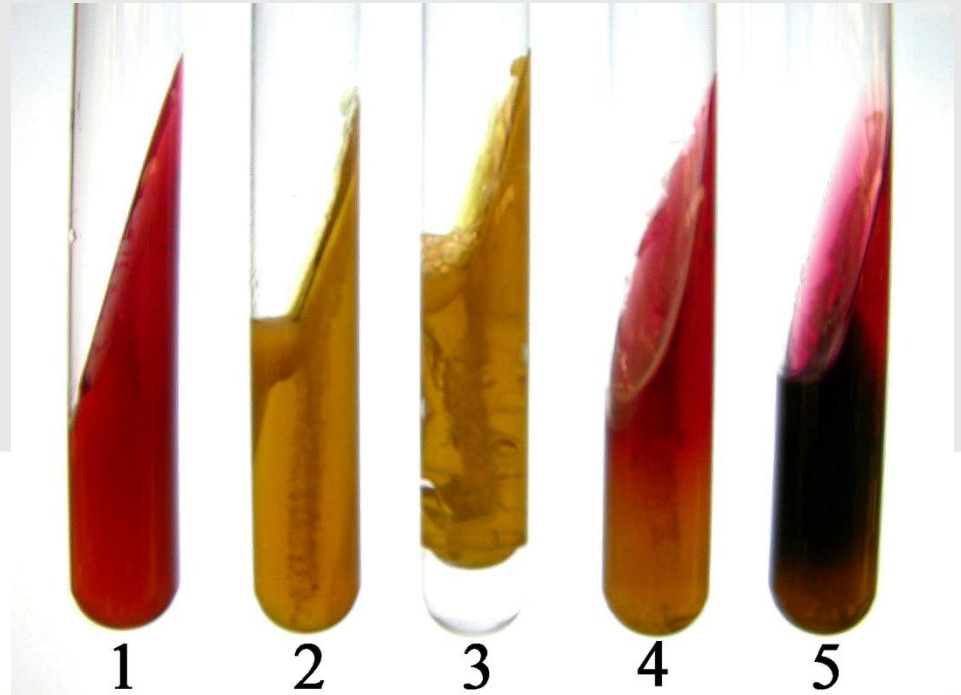
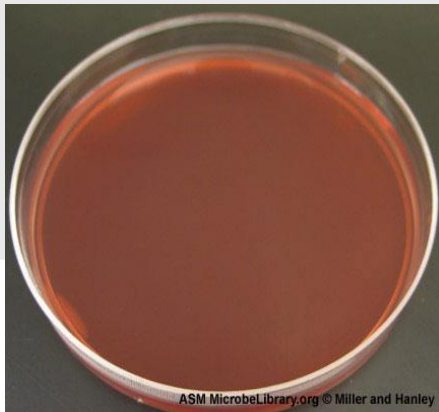
Εμβολιασμός: Η τοποθέτηση μικρής ποσότητας βιολογικού υλικού σε θρεπτικά υλικά

Ενοφθαλμισμός: Η μεταφορά ενός μικροβίου από ένα θρεπτικό υλικό σε άλλο

Ανακαλλιέργεια: η μεταφορά ενός μικροβίου από στερεό θρεπτικό υλικό σε άλλο στερεό θρεπτικό υλικό, με σκοπό την παραγωγή καθαρής καλλιέργειας

Καθαρή καλλιέργεια: καλλιέργεια ενός μόνο είδους μικροβίων (αποτελείται από μικρόβια που προέρχονται από ένα αρχικό μικρόβιο)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Επεξήγηση βασικών χειρισμών

- **Εμβολιασμός (Inoculation)**: μεταφορά αποικίας βακτηρίου από ένα στερεό θρεπτικό μέσο σε υγρό, με τη βοήθεια κρίκου.
- **Streaking plate technique**: άπλωμα ποσότητας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο.
- **Pour plate technique**: μεταφορά ποσότητας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε τρυβλίο Petri και ανακάτεμα με υγροποιημένο θρεπτικό μέσο με άγαρ.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται όταν οι συνθήκες που επικρατούν γύρω από το μικροπεριβάλλον τους (υπόστρωμα) είναι ιδανικές για τον πολλαπλασιασμό τους

Η απομόνωση, διατήρηση και πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία ονομάζουμε αλλιώς σαν θρεπτικό υλικό - υλικά (medium - media)

Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά

Ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζει ή καθορίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών είναι και τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος



Το υπόστρωμα που θα αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά τα οποία τους είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό τους και δεν μπορούν τα ίδια να συνθέσουν

Μικροβιολογικά Θρεπτικά υποστρώματα - Ορισμός

Κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καλείται θρεπτικό υπόστρωμα

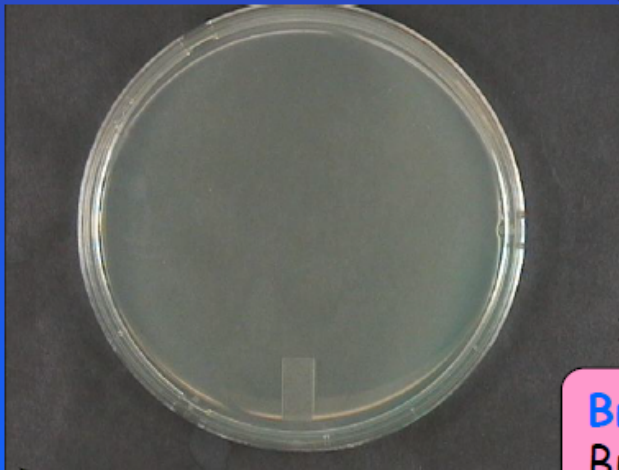
Πηγή άνθρακα: Κυρίως μονο- και δι-σακχαρίτες και σπανιότερα ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

Πηγή αζώτου: Μπορεί να είναι ανόργανη (αμμωνιακά άλατα), ή οργανική (πεπτόνη, τρυπτόνη)

Βιταμίνες: Ως δομικά συστατικά διαφόρων ενζύμων, π.χ. Βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη.

Ιχνοστοιχεία: Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Co, κλπ

Ανόργανα άλατα: π.χ. άλατα νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Επίσης φωσφορικά άλατα.



Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων - Ι

Υγρά υποστρώματα

Broth media

Στερεά υποστρώματα

Solid media

Για την παρασκευή των στερεών υποστρωμάτων θα πρέπει να προστεθεί ένας πηκτικός παράγοντας που ονομάζεται άγαρ

Το άγαρ παρουσιάζει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Είναι ουδέτερο συστατικό και δεν επιδρά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού
2. Δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς
3. Χρησιμοποιείται σε περιεκτικότητα 1,2-1,5%. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα παρεμποδίζει την ανάπτυξη λόγω μείωσης της τιμής της ενεργότητας ύδατος
4. Ρευστοποιείται σε βραστό νερό, ενώ σε θερμοκρασία 40°C ή χαμηλότερα στερεοποιείται
5. Παραμένει ρευστό σε θερμοκρασία >40-45°C.
6. Όταν χρησιμοποιείται για εμβολιασμό θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 45-47°C για να μην θανατωθούν οι μικροοργανισμοί

Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηκτικός παράγοντας η ζελατίνη, η οποία όμως παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα σε σχέση με το άγαρ:

1. Προστίθεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (12-15%)
2. Επηρεάζεται από το χαμηλό pH και συχνά υδρολύεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα των μικροοργανισμών.
3. Ρευστοποιείται σε θερμοκρασία $> 25^{\circ}\text{C}$. Συνεπώς συνδυασμός χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Θρεπτικά υποστρώματα ή θρεπτικά υλικά ονομάζονται τεχνητά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια μικροβίων στο εργαστήριο

Διάκριση θρεπτικών υλικών

Ανάλογα με την υφή τους:

Υγρά
Στερεά
Ημίρρευστα

Ανάλογα με τη σύστασή τους:

Κοινά
Εμπλουτισμένα
Εκλεκτικά
Διαφοροποιητικά

Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙ

Φυσικά υποστρώματα



Τα συστατικά αυτών των υλικών βρίσκονται σε ακατέργαστη μορφή, δλδ. δεν γνωρίζουμε ακριβώς τη σύνθεση, λαμβάνονται από τη φύση, χυμός τομάτας, εκχυλίσματα φρούτων, κλπ

Συνθετικά υποστρώματα



Παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία και γνωρίζουμε πλήρως τη σύνθεση, π.χ. MacConkey Agar

Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

Γενικά υποστρώματα

Τα γενικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών. Τυπικό παράδειγμα είναι το Nutrient agar ή broth που αποτελείται από εκχύλισμα κρέατος και πεπτόνη.



Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

Εξειδικευμένα υποστρώματα

Τα **εξειδικευμένα υποστρώματα** χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και απαρίθμηση ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών. ΔΗΛΑΔΗ η σύνθεσή τους δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των άλλων μικροοργανισμών. Αυτό επιτυγχάνεται με:

- τη διόρθωση του pH στο υπόστρωμα
- την προσθήκη αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη δράση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών
- την προσθήκη ουσιών που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση διαφορετικών αποικιών μεταξύ τους



Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

Εξειδικευμένα
υποστρώματα

Επιλεκτικά (elective): τα οποία ικανοποιούν τις απαιτήσεις μίας ή περισσότερων ομάδων βακτηρίων χωρίς να παρεμποδίζουν όμως τελείως άλλες ομάδες

Εκλεκτικά (selective): τα οποία περιέχουν έναν ή περισσότερους παρεμποδιστικούς παράγοντες, οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη της ομάδας που θέλουμε να απομονώσουμε

Παράδειγμα επιλεκτικού υποστρώματος

MRS agar

ρΗ Διορθωμένο	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται
8	<i>Carnobacterium</i> spp.
7	Στρεπτόκοκκοι
<5.7	Οξυανθεκτικά γαλακτικά βακτήρια
<5.7	Ζύμες

Διόρθωση του ρΗ έχει σαν αποτέλεσμα την απομόνωση συγκεκριμένων ομάδων και ειδών

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Σύσταση θρεπτικών υλικών

Τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να έχουν τέτοια σύσταση, ώστε να εξασφαλίζεται αφενός η παροχή των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών για την ανάπτυξη των μικροβίων και αφετέρου άριστη οσμωτική πίεση και άριστο pH.

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Σύσταση θρεπτικών υλικών

Νερό

- Χρησιμοποιείται ως διαλύτης
- Χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό

Πεπτόνη

- Κύρια πηγή αζώτου για τα μικρόβια
- Παράγεται από την εκχύλιση φυσικών προϊόντων πλούσιων σε πρωτεΐνες

Άλατα

- Απαραίτητα για την ανάπτυξη μικροβίων. Χρησιμοποιούνται επίσης για τη ρύθμιση του pH και της οσμωτικής πίεσης
- Αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για ορισμένα μικρόβια

Σάκχαρα

- Κύρια πηγή άνθρακα για τα περισσότερα ετερότροφα μικρόβια
- Χρησιμοποιούνται στη μελέτη βιοχημικών ιδιοτήτων των μικροβίων

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Σύσταση θρεπτικών υλικών

Εκχύλισμα κρέατος

- Παρασκευάζεται από άπαχο κρέας μετά από βρασμό
- Αποτελεί πηγή πρωτεϊνών, αλάτων και αυξητικών παραγόντων

Βιολογικά υλικά

- Περιλαμβάνουν αίμα, ορό αίματος, χολή κ.α.
- Απαραίτητα για την ανάπτυξη ορισμένων απαιτητικών μικροβίων

Χρωμομετρικοί δείκτες

- Απαραίτητα για την ανάπτυξη μικροβίων. Χρησιμοποιούνται επίσης για τη ρύθμιση του pH και της οσμωτικής πίεσης
- Για ορισμένα μικρόβια αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες

Άγαρ

- Πολυσακχαρίτης από ροδοφύκη. Διαλύεται στο νερό στους 80° και πήζει στους 32-40° C
- Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1-2% για τη μετατροπή των υγρών θρεπτικών υλικών σε στερεά
- Δεν χρησιμοποιείται από τα μικρόβια ως θρεπτική ουσία

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Ζύγιση της ουσίας

- Η ζύγιση γίνεται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας

Διάλυση της σκόνης

- Η διάλυση της ουσίας γίνεται σε απεσταγμένο νερό
- Τα στερεά θρεπτικά υλικά διαλύονται με θέρμανση

Μέτρηση pH

- Η μέτρηση του pH γίνεται με ειδικό pHμετρο σε θερμοκρασία δωματίου

Διανομή θρεπτικού υλικού

- Το υλικό διανέμεται σε σωληνάρια ή γυάλινες φιάλες. **Αν μοιράζεται σε τρυβλία, πρέπει να προηγηθεί η αποστείρωση**

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Αποστείρωση θρεπτικού υλικού

- Η αποστείρωση των περισσότερων θρεπτικών υλικών γίνεται σε αυτόκαυστο, στους 118-121° C για 15-20min

Έλεγχος αποστείρωσης

- Η αποστείρωση ελέγχεται με βιολογικούς δείκτες ή ταινίες αποστείρωσης ή τυχαία επώαση δειγμάτων

Αποθήκευση θρεπτικού υλικού

- Τα περισσότερα θρεπτικά υλικά αποθηκεύονται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4° C

Παρασκευή LB άγαρ



ΑΙΜΑΤΟΥΧΟ ΑΓΑΡ

- Χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας μικροβίων, κυρίως αυτών που έχουν ιδιαίτερες τροφικές απαιτήσεις, καθώς και για τον έλεγχο της αιμόλυσης που προκαλούν οι στρεπτόκοκκοι και άλλοι μικροοργανισμοί
- Παρασκευάζεται από βάση αιματούχου άγαρ (θρεπτικό άγαρ, Columbia agar) με προσθήκη αίματος σε τελική συγκέντρωση 5-10%
- Το αίμα προέρχεται από άλογο (διατίθεται στο εμπόριο), από άνθρωπο (από τράπεζες αίματος) ή από πειραματόζωα (κουνέλια, αρνιά κ.α.)

- Το θρεπτικό άγαρ περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη μεγάλου πλήθους μικροβίων. Το Columbia agar περιέχει πεπτόνες που προωθούν την άριστη ανάπτυξη των αποικιών, εκχύλισμα ζυμών που είναι πηγή της βιταμίνης Β και άμυλο το οποίο είναι πηγή ενέργειας.

- Το αίμα περιέχει θρεπτικές ουσίες, αυξητικούς παράγοντες και ένζυμα, απαραίτητα για την ανάπτυξη ορισμένων μικροβίων

- Γίνεται δυνατή η ανίχνευση της αιμόλυσης βάση της οποίας μπορούν να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί.

Οι Στρεπτόκοκκοι και άλλα είδη μικροβίων παράγουν αιμολυσίνες οι οποίες λύνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαυγούς (β-αιμόλυση) ή θολής (α-αιμόλυση) ζώνης γύρω από τις αποικίες τους

ΛΗΨΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ



Για την ορθή διάγνωση έχει μεγάλη σημασία:

- Η σωστή συλλογή των δειγμάτων
- Ο χρόνος της δειγματοληψίας
- Η ταχύτητα μεταφοράς στο εργαστήριο
- Η επεξεργασία και ο τρόπος χειρισμών

Βασικές προφυλάξεις κατά τη συλλογή δειγμάτων

Πλύσιμο των χεριών πριν και μετά τη συλλογή του δείγματος

Χρήση ιατρικής μπλούζας και γαντιών πριν την επαφή με βιολογικά υγρά ή τους βλεννογόνους του ασθενή. Πλύσιμο των χεριών πριν και μετά τη χρήση γαντιών

Χρήση μάσκας ή προστατευτικών γυαλών αν υπάρχει κίνδυνος εκτίναξης βιολογικών υγρών

Καθάρισμα των επιφανειών με κατάλληλο απολυμαντικό αμέσως μόλις δημιουργηθούν μολυσματικά σταγονίδια

Αποφυγή τραυματισμού κατά τη χρήση αιχμηρών αντικειμένων και απόρριψή τους στα κατάλληλα δοχεία μετά τη χρήση τους

Απόρριψη των υλικών που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη συλλογή του δείγματος σύμφωνα με τους κανόνες απόρριψης βιολογικών αποβλήτων



Μεταφορά δειγμάτων

Κάθε δοχείο ή σωληνάριο ή υλικό μεταφοράς δειγμάτων πρέπει να φέρει ετικέτα με στοιχεία ταυτότητας του δείγματος και να συνοδεύεται από συμπληρωμένο «Παραπεμπτικό Εξετάσεων»

Το δοχείο ή το σωληνάριο πρέπει να είναι κλεισμένο με ασφάλεια

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες ή τα δοχεία δειγμάτων πρέπει να τοποθετούνται σε ειδικό πλαστικό σάκο μεταφοράς δειγμάτων

Τα μολυσματικά δείγματα σημαίνονται με ειδική ετικέτα

Δείγμα ούρων

Σχολαστικό πλύσιμο των γεννητικών οργάνων με νερό και σαπούνι

Συλλογή μέσου ρεύματος ούρησης σε αποστειρωμένο δοχείο με κάλυμμα ή δοκιμαστικό σωλήνα με πώμα

Σε ασθενείς που δε συνεργάζονται και σε βρέφη η συλλογή των ούρων γίνεται απ' ευθείας από την ουροδόχο κύστη με υπερηβική παρακέντηση

Είναι καλύτερα να συλλέγονται τα πρώτα πρωινά ούρα που είναι πυκνότερα και έχουν υψηλό αριθμό μικροοργανισμών. Η τελευταία ούρηση πριν τη συλλογή πρέπει να προηγείται τουλάχιστον τρεις ώρες

Τα ούρα είναι καλό θρεπτικό υλικό για πολλά μικρόβια, τα οποία αναπτύσσονται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου. Για το λόγο αυτό πρέπει να εξετάζονται σε λιγότερο από 2 ώρες από τη συλλογή τους. Αν αυτό δεν είναι δυνατόν πρέπει να διατηρούνται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-8° C

Δείγμα αίματος

Συλλογή με σύριγγα μιας χρήσης κατά προτίμηση κατά την άνοδο του πυρετού και πριν την εμφάνιση ρίγους και τη λήψη αντιβιοτικών

Το αίμα καλλιεργείται άμεσα αμέσως μετά τη συλλογή του

Συνήθως εμβολιάζονται δύο δείγματα στο ίδιο θρεπτικό υλικό το ένα σε αερόβιες και το άλλο σε αναερόβιες συνθήκες

Δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ)

Η συλλογή του ΕΝΥ γίνεται με οσφυνωτιαία παρακέντηση από τον κλινικό γιατρό

Η εξέταση του ΕΝΥ πρέπει να γίνεται εντός μισής ώρας από τη συλλογή του γιατί καταστρέφονται τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο

Δείγμα φαρυγγικού εκκρίματος

Ο ασθενής είναι καθιστός σε περιοχή με καλό φωτισμό. Η χρήση γλωσσοπίεστρου βοηθάει στην καλύτερη επισκόπηση της περιοχής.

Η συλλογή γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό με περιστροφικές κινήσεις από την περιοχή της βλάβης. Οι κινήσεις πρέπει να είναι γρήγορες για να αποφευχθεί ο κίνδυνος εμετού από το άρρωστο

Τα μικρά παιδιά είναι καλύτερα να κάθονται στα γόνατα ενός τρίτου προσώπου και να ακινητοποιούνται



Δείγμα ρινικού εκκρίματος

Συλλογή με βαμβακοφόρο στυλεό που έχει υγρανθεί με φυσιολογικό ορό

Η συλλογή γίνεται από τα βαθύτερα σημεία της ρινικής κόγχης (μέχρι 2 cm)

Συνήθως λαμβάνονται ξεχωριστά δείγματα από τον αριστερό και δεξί ρώθωνα



Δείγμα πτυέλων

Ο ασθενής πλένει τη στοματική κοιλότητα με νερό αρκετές φορές (γαργάρες και μπουκώματα). Δεν χρησιμοποιούνται οδοντόπαστα ή αντισηπτικά

Τα πτύελα τα συλλέγει ο ασθενής σε αποστειρωμένο δοχείο κάθε φορά που έχει βήχα με απόχρεμψη. Κατάλληλος όγκος περίπου 5ml. Δεν πρέπει να γίνεται ανάμειξη με σάλιο

Κατάλληλα είναι τα πρωινά δείγματα πριν το πρόγευμα ή τη λήψη φαρμάκων

Δείγμα ωτικού εκκρίματος

Ευθειάζεται ο έξω ακουστικός πόρος και καθαρίζεται με αντισηπτικό διάλυμα

Μετά από 5 λεπτά συλλέγεται δείγμα με βαμβάκοφόρο στυλεό που έχει διαβρεχτεί με στείρο φυσιολογικό ορό

Το δείγμα εμβολιάζεται αμέσως σε θρεπτικό υλικό ή τοποθετείται σε υλικό μεταφοράς



Δείγμα από πύον μολυσμένων τραυμάτων δέρματος ή πυώδεις συλλογές

Συλλογή από την περιφέρεια του έλκους με βαμβακοφόρο στυλεό ή με σύριγγα από τραύματα

Από βαθειά τραύματα προηγείται άνοιγμα με αποστειρωμένο νυστέρι και ακολουθεί αναρρόφηση με σύριγγα από τις βαθύτερες περιοχές του τραύματος

Στην περίπτωση περιχαρακωμένου τραύματος η λήψη γίνεται από το όριο υγιούς και πάσχουσας περιοχής

Δείγμα από τον επιπεφυκότα

Το κεφάλι του αρρώστου φέρεται προς τα πίσω σε θέση με καλό φωτισμό

Συλλογή με στείρο κρικοφόρο στυλεό μικρής διαμέτρου . Το έκκριμα της βλεφαριδικής σχισμής μπορεί να συλλεχθεί με βαμβακοφόρο στυλεό

Το δείγμα εμβολιάζεται αμέσως



Δείγμα κοπράνων

Τα κόπρανα συλλέγονται σε ειδικά δοχεία συλλογής. Τα διαρροϊκά κόπρανα συλλέγονται σε δοχείο με κουταλάκι

Τα κόπρανα πρέπει να εξετάζονται και μακροσκοπικά για τυχόν παρουσία αίματος ή βλέννας

Το δοχείο δεν πρέπει να γεμίζεται πολύ με κόπρανα γιατί είναι δυνατόν η παραγωγή αερίων από τα μικρόβια να εκτινάξει το πώμα



Δείγμα κοιλιακού εκκρίματος

Καλό πλύσιμο των γεννητικών οργάνων με νερό και σαπούνι

Η ασθενής ξαπλώνει στο μαιευτικό κρεβάτι και συλλογή γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό

Το δείγμα εμβολιάζεται αμέσως ή μπαίνει σε υλικό μεταφοράς.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ



Τεχνικές απομόνωσης αποικιών

Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking)

Η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό μίας αποικίας ενός μικροοργανισμού και την δημιουργία μίας καθαρής καλλιέργειας (pure culture).

Η τεχνική μπορεί να θεωρηθεί ως μία διαδικασία αραίωσης των κυττάρων σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, έτσι ώστε μετά την επώαση να σχηματιστούν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες.

Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking)

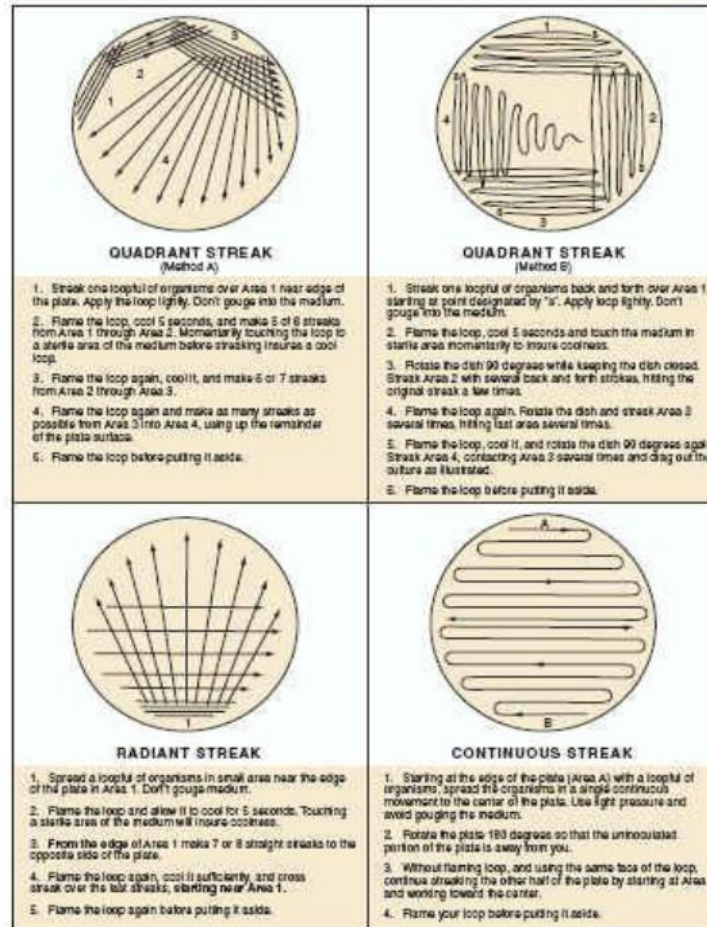
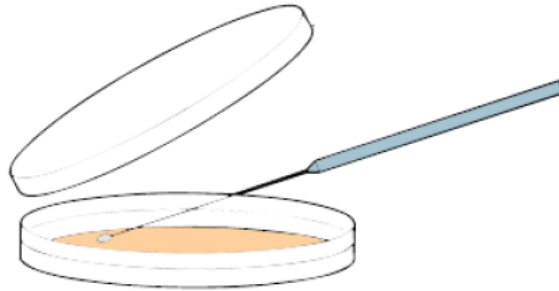
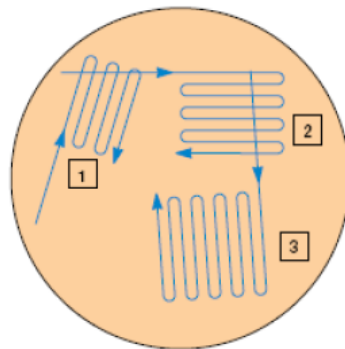


Figure 24.4 Four different streak techniques

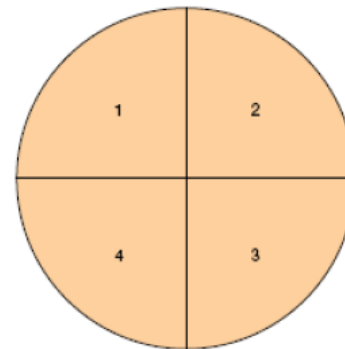
Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking)



(a)

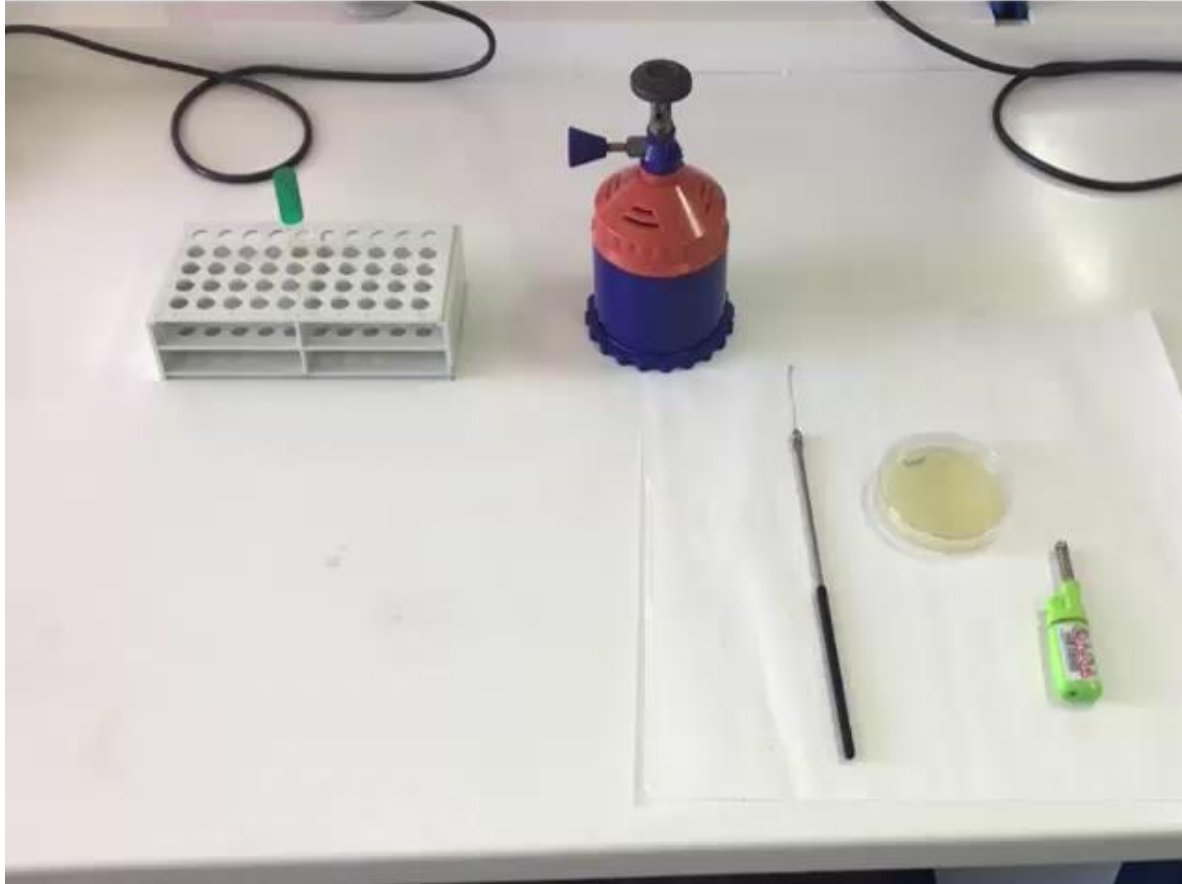


(b)



(c)

Streaking plate

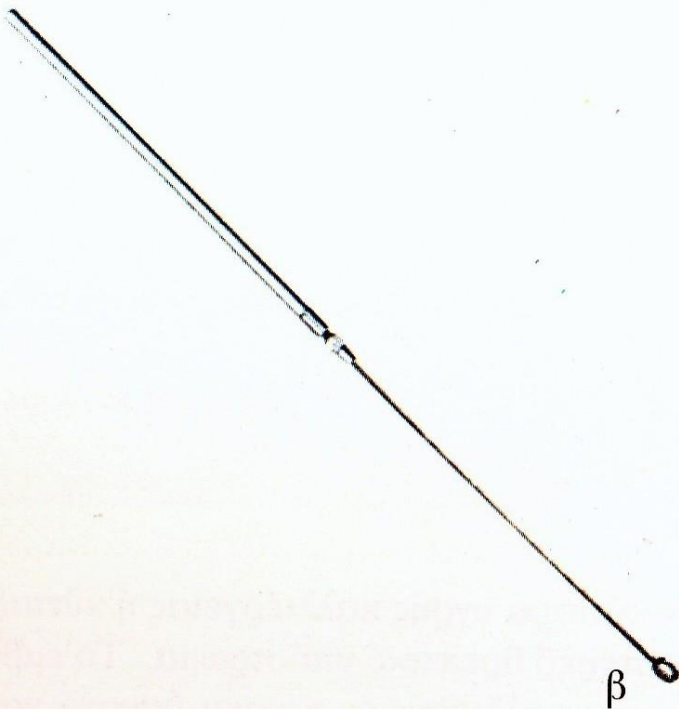


Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking)





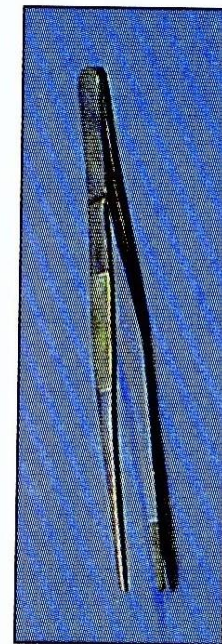
α



β

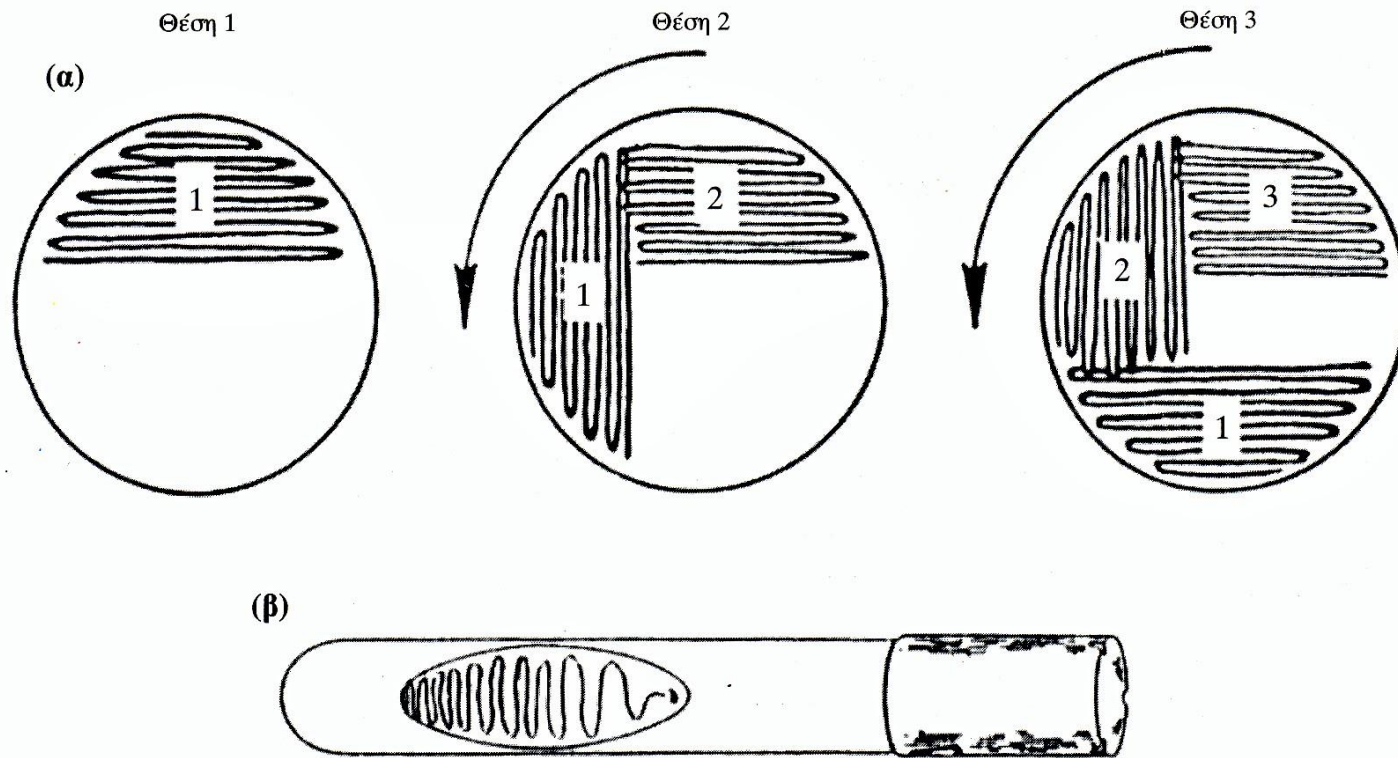


γ

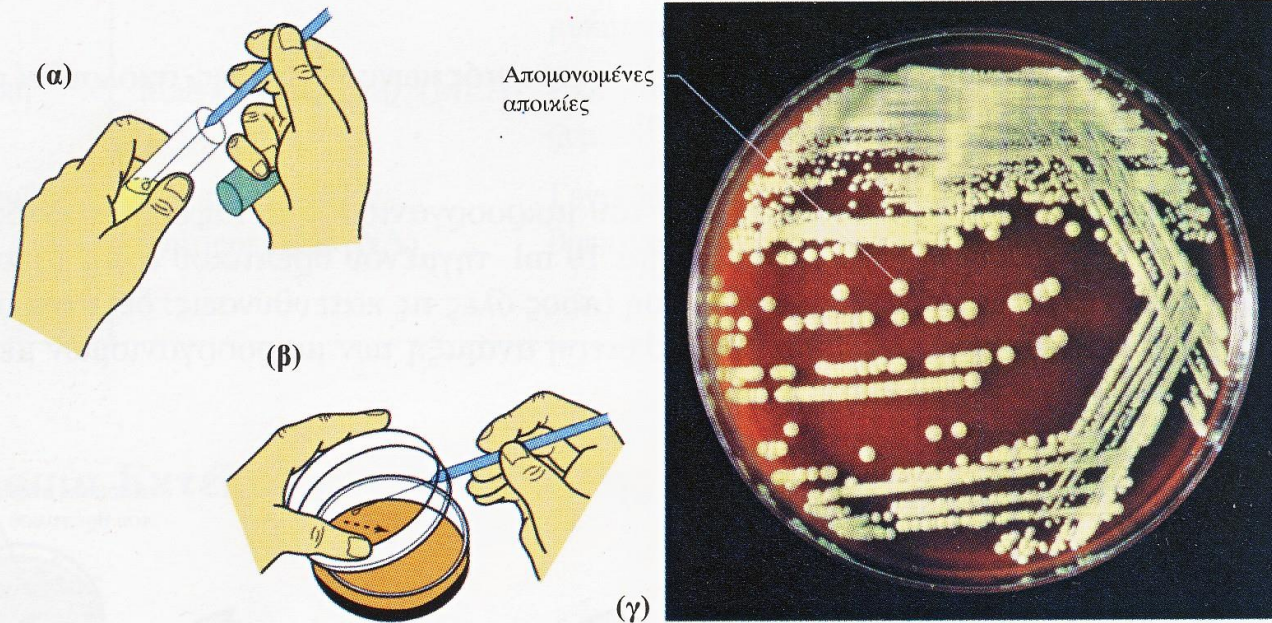


δ

Εικόνα 1. Μικροβιολογικά εργαλεία εμβολιασμού. (α) Σιφώνιο, (β) κρίκος εμβολιασμού, (γ) ανατομική βελόνα, (δ) ανατομική λαβίδα

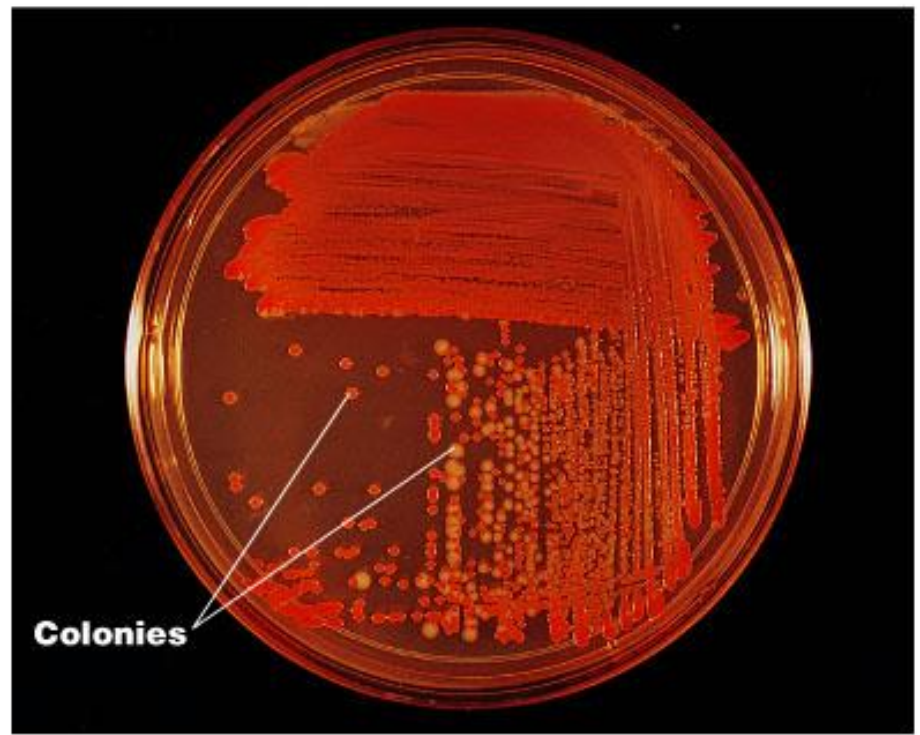
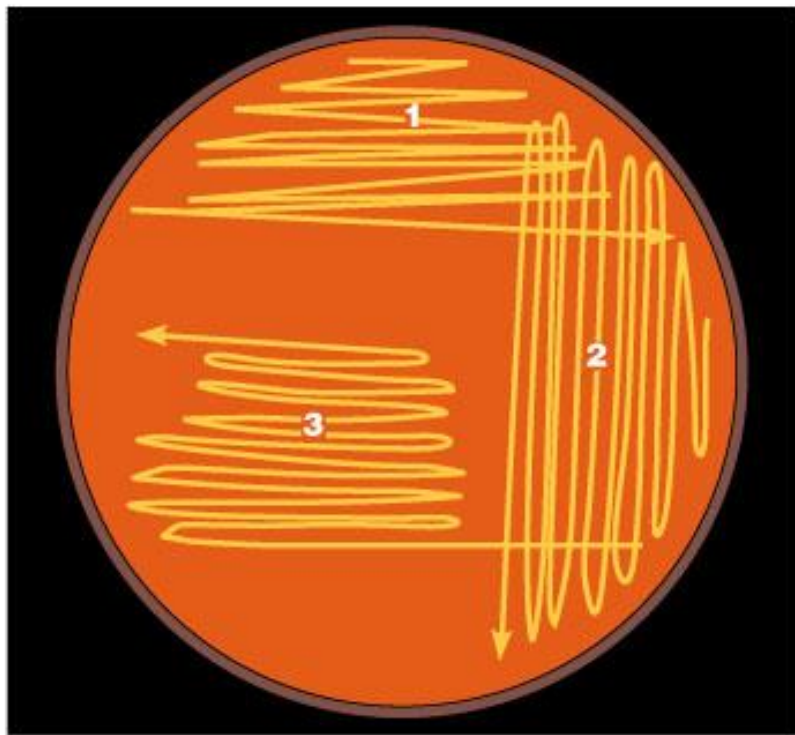


Εικόνα 3. Εμβολιασμός στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών. (α) Διάφορες θέσεις του τρυβλίου κατά τον εμβολιασμό. (β) Εμβολιασμός σε κεκλιμένη επιφάνεια δοκιμαστικού σωλήνα με την ίδια μέθοδο.

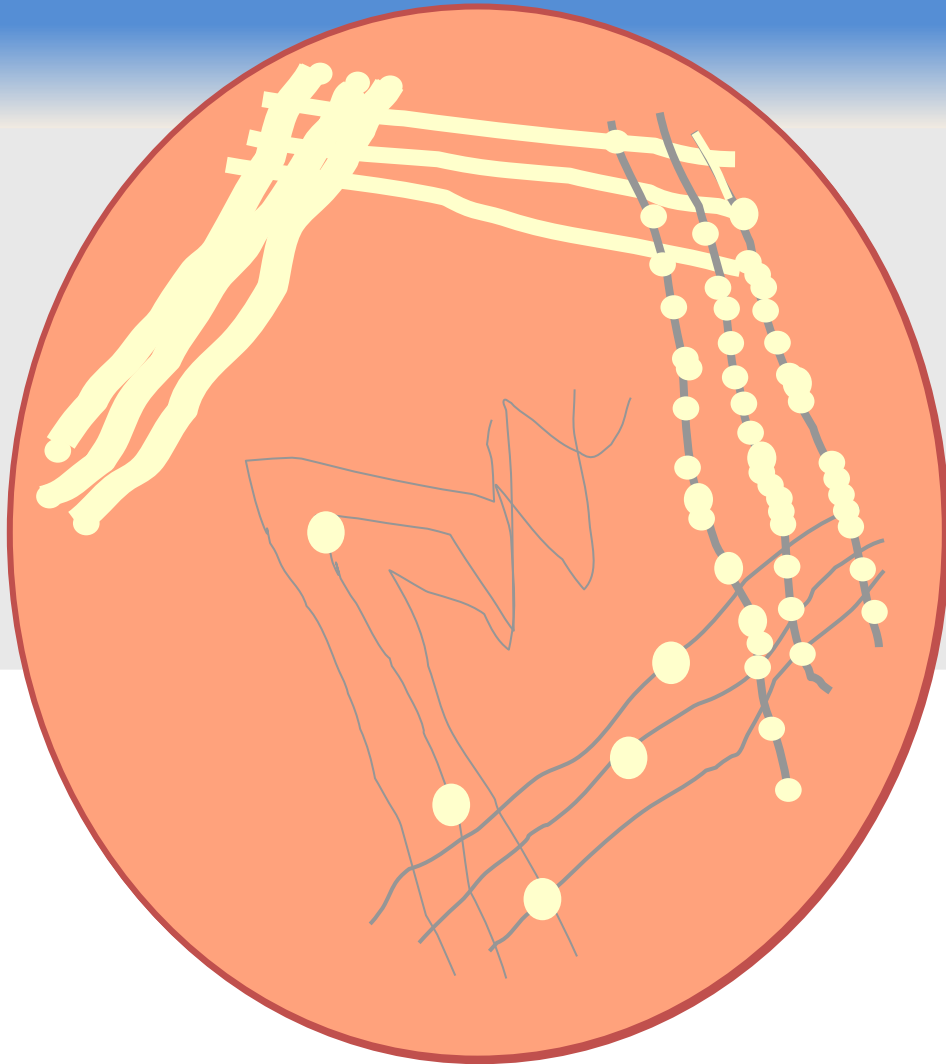


Εικόνα 2. Εμβολιασμός στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών. Εμβολιασμός (α) σε κεκλιμένη επιφάνεια και (β) σε τρυβλίο Petri. (γ) Απομονωμένες αποικίες σε τρυβλίο Petri.

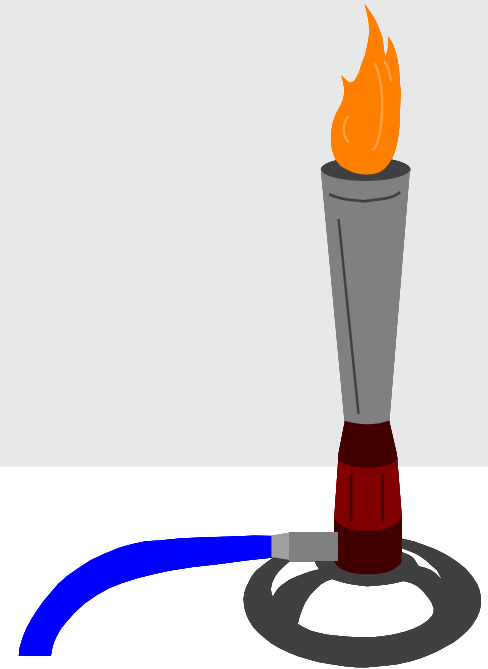
Streak Plate



How to streak out an inoculum to single colonies



now flame the loop



Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιείται με δοκιμασίες που στηρίζονται σε:

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

- χαρακτηριστικά κυττάρου
- πραγματοποιείται με χρώση Gram ή άλλες χρώσεις

Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά

- Ανάπτυξη σε συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά
- Εξετάζονται οι συνθήκες ανάπτυξης, ο χρόνος επώασης, η μορφολογία των αποικιών

Μεταβολικές ιδιότητες

- Ελέγχεται η παραγωγή ενζύμων και άλλων ενώσεων, η διάσπαση ουσιών κ.α. (βιοχημική ταυτοποίηση)

Αντιγονικά χαρακτηριστικά

Έλεγχος της αντιγονικής σύστασης του κυττάρου (ορολογική ταυτοποίηση)

Σύσταση γενετικού υλικού

Έλεγχος της ομολογίας στην αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού των μικροβίων

1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυττάρου μικροβίων

Με τη χρώση Gram διαχωρίζονται τα βακτήρια
σε Gram (+) και Gram (-) και αποκαλύπτεται το
σχήμα και η διάταξη των κυττάρων

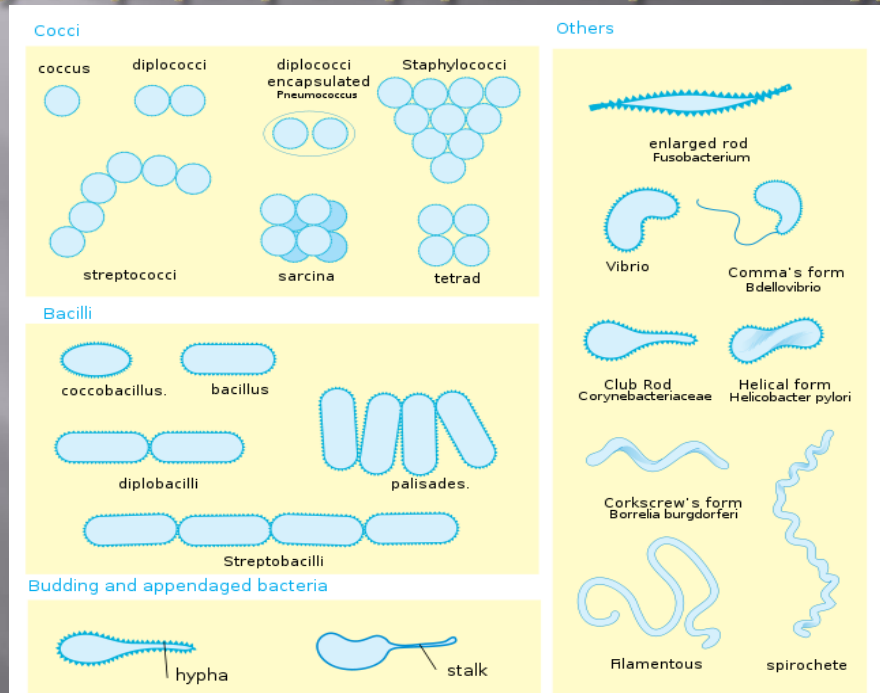


Gram (+) βακτήρια



Gram (-) βακτήρια

Ταξινόμηση σύμφωνα με το σχήμα



Κόκκοι (διπλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι σταφυλόκοκκοι κλπ),
βακτηρίδια (κοκκοβακτηρίδια, διπλοβάκιλλοι, στρεπτοβάκιλλοι
κλπ) άλλες μορφές (υφιοειδή, κορυνοειδή, σαν κόμμα,
σπειροχαίτες, κλπ).

2. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά

Ανάπτυξη μικροβίων σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά

Εξετάζεται η θερμοκρασία ανάπτυξης (μεσόφιλα, θερμοφιλα, ψυχρόφιλα), το οξυγόνο (αερόβια, αναερόβια), η απαίτηση υγρασίας

Χρόνος επώασης: 24-48 ώρες για τα περισσότερα μικρόβια. Υπάρχουν μικρόβια που απαιτούν περισσότερο χρόνο (π.χ. μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης και Βρουκέλλες 15 – 40 ημέρες)

3. Μορφολογία αποικιών. Οι αποικίες εξετάζονται ως προς:

Το σχήμα (κυκλική, νηματοειδής, στικτή κ.α.)

Το ύψος (επίπεδη, κυρτή, υπερυψωμένη κ.α.)

Το χρώμα (λευκές, κόκκινες, κίτρινες κ.α.)

Το περιθώριο (κυκλικό, σγουρό, κροσσωτό, κ.α.)

Την κίνηση (π.χ. ερπυσμός του Πρωτέα)

Τις μεταβολές στο θρεπτικό υλικό (αιμόλυση, παραγωγή βλέννας, παραγωγή χρωστικής, χαρακτηριστική μυρωδιά)

Σχήμα αποικιών

Στικτή



under 1mm in diameter

Κυκλική



Νηματοιειδής



long, irregular, interwoven threads

Ριζοειδής



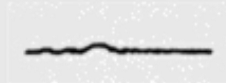
irregular, branched

Ακανόνιστη



Ύψος αποικιών

Πολύ λεπτή, διάχυτη



very thin, spreading

Επίπεδη



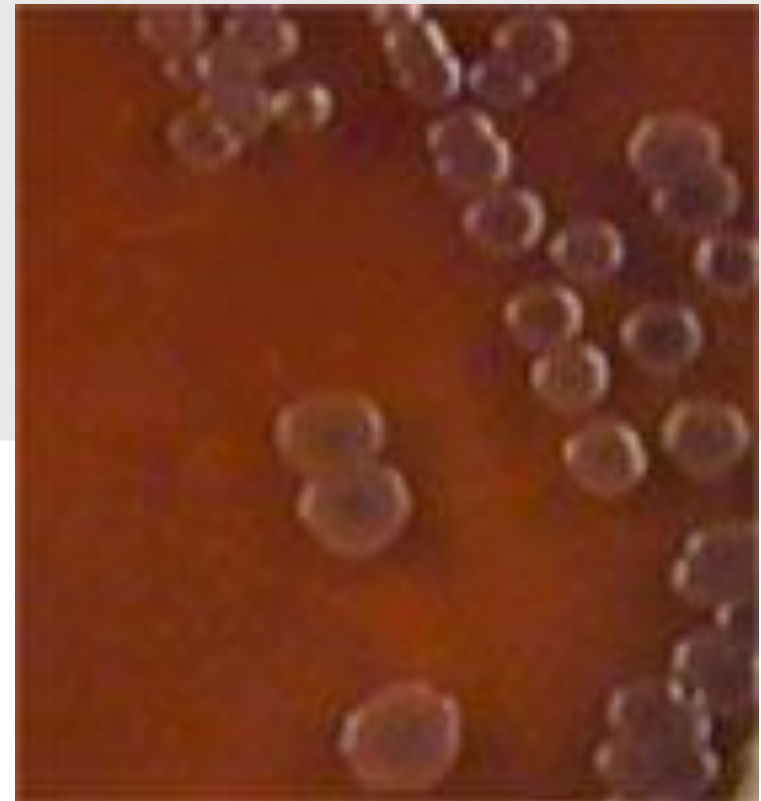
Υπερυψωμένη



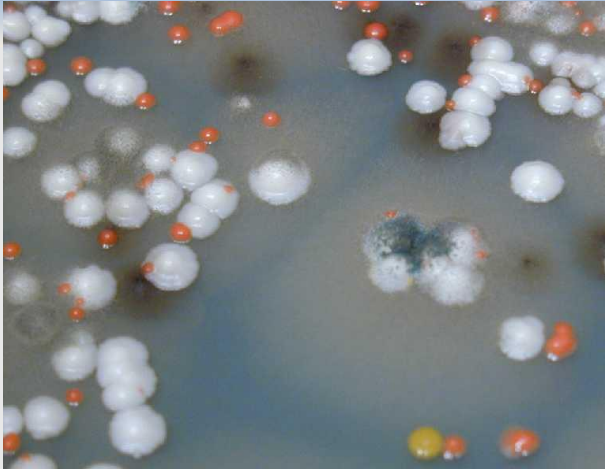
Κυρτή



Με υπερυψωμένο κέντρο



Χρώμα αποικιών



Περίγραμμα αποικιών

Κυκλικό



Κροσσωτό



undulating



Σγουρό



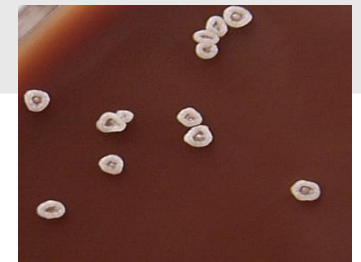
radiating rings



Νηματοιδής



concentric rings

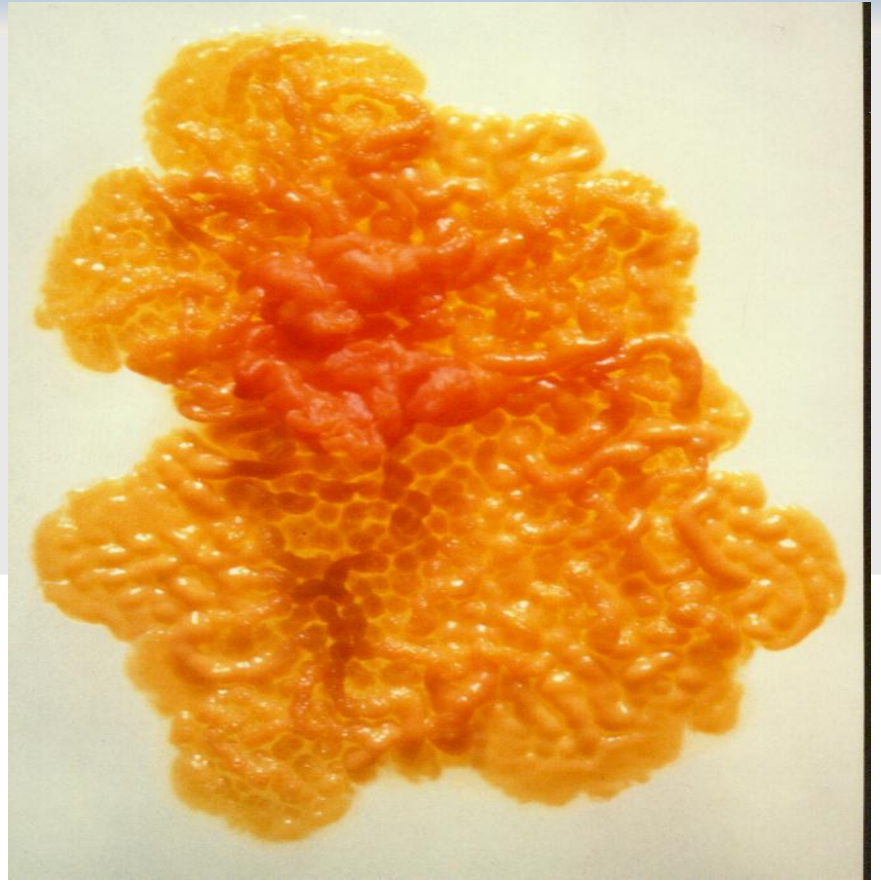
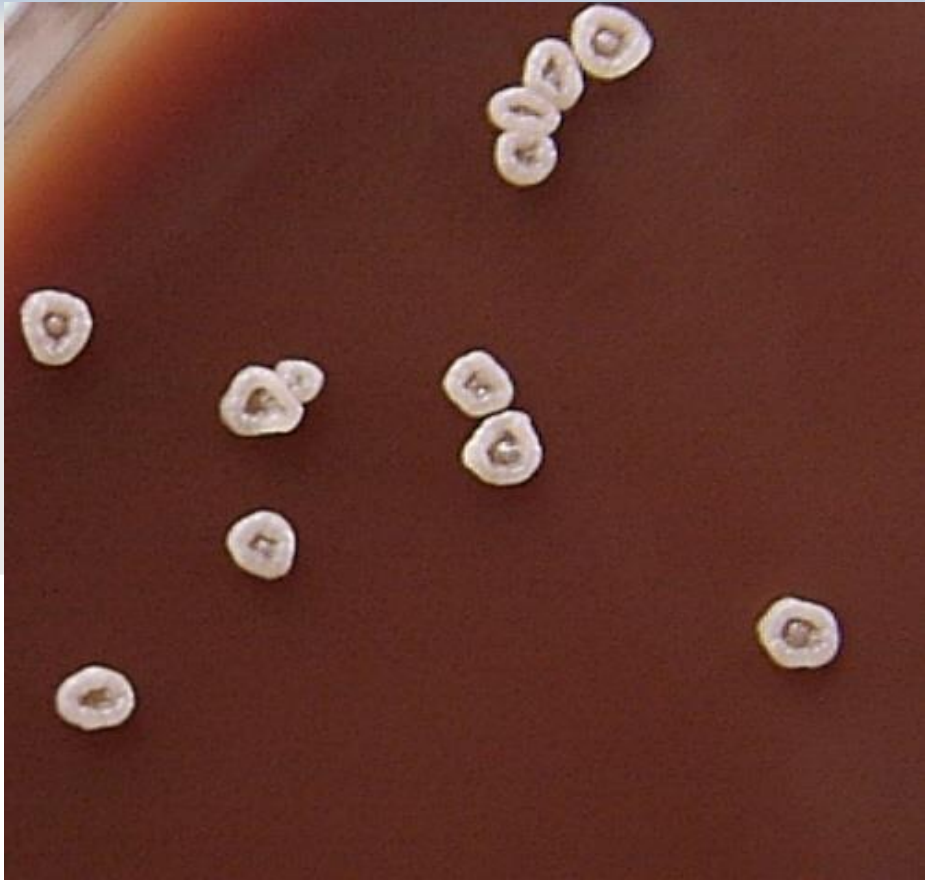


Κυματοειδής

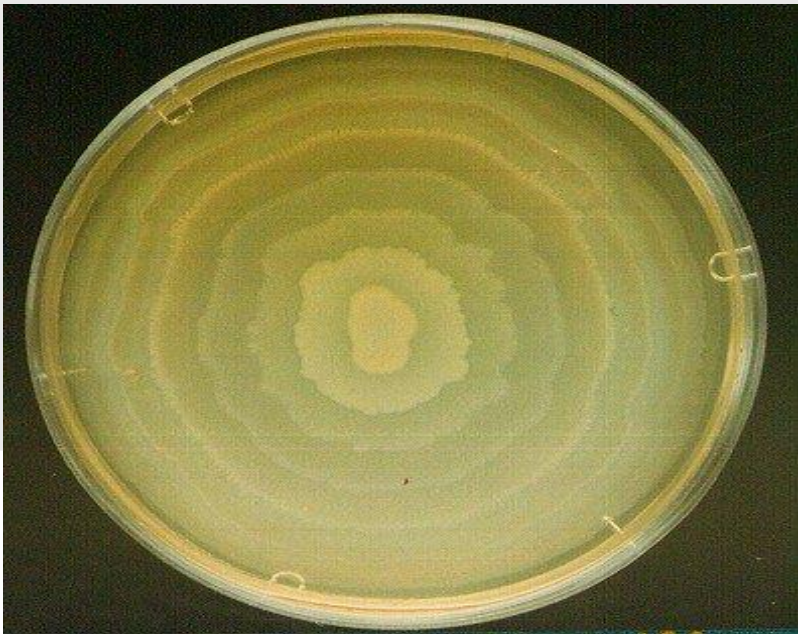


wrinkled

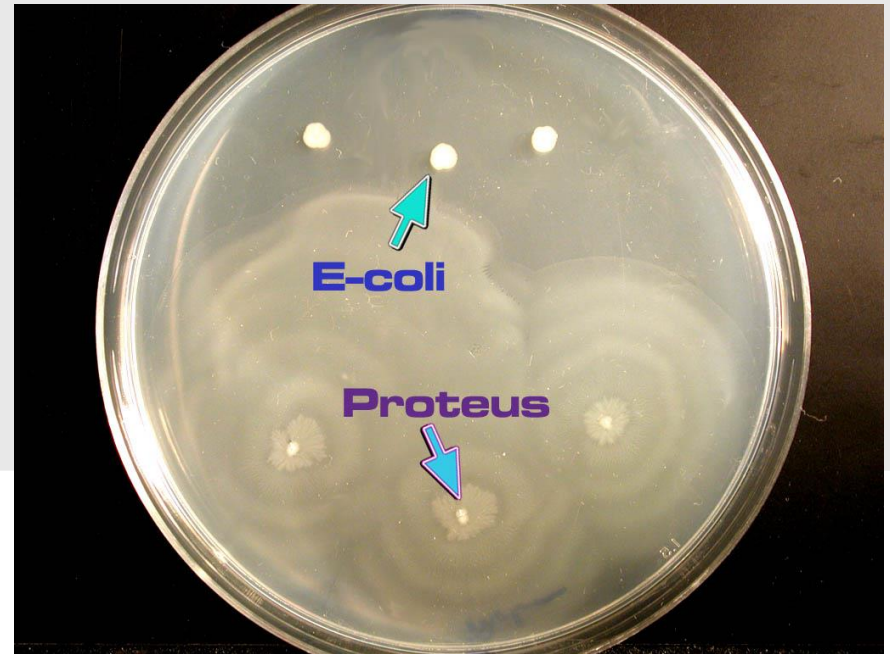




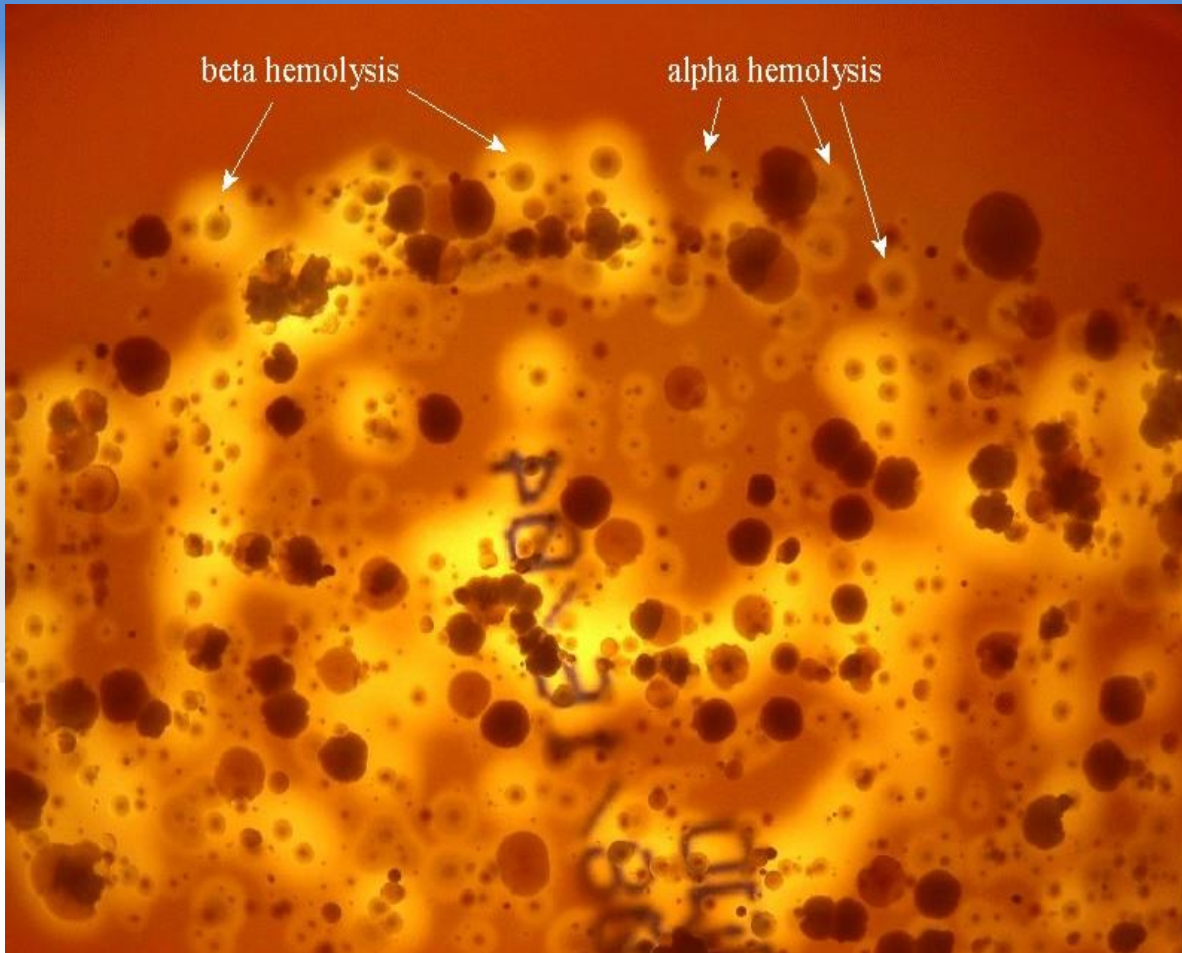
Κίνηση - ερπισμός



Proteus mirabilis



Αιμόλυση

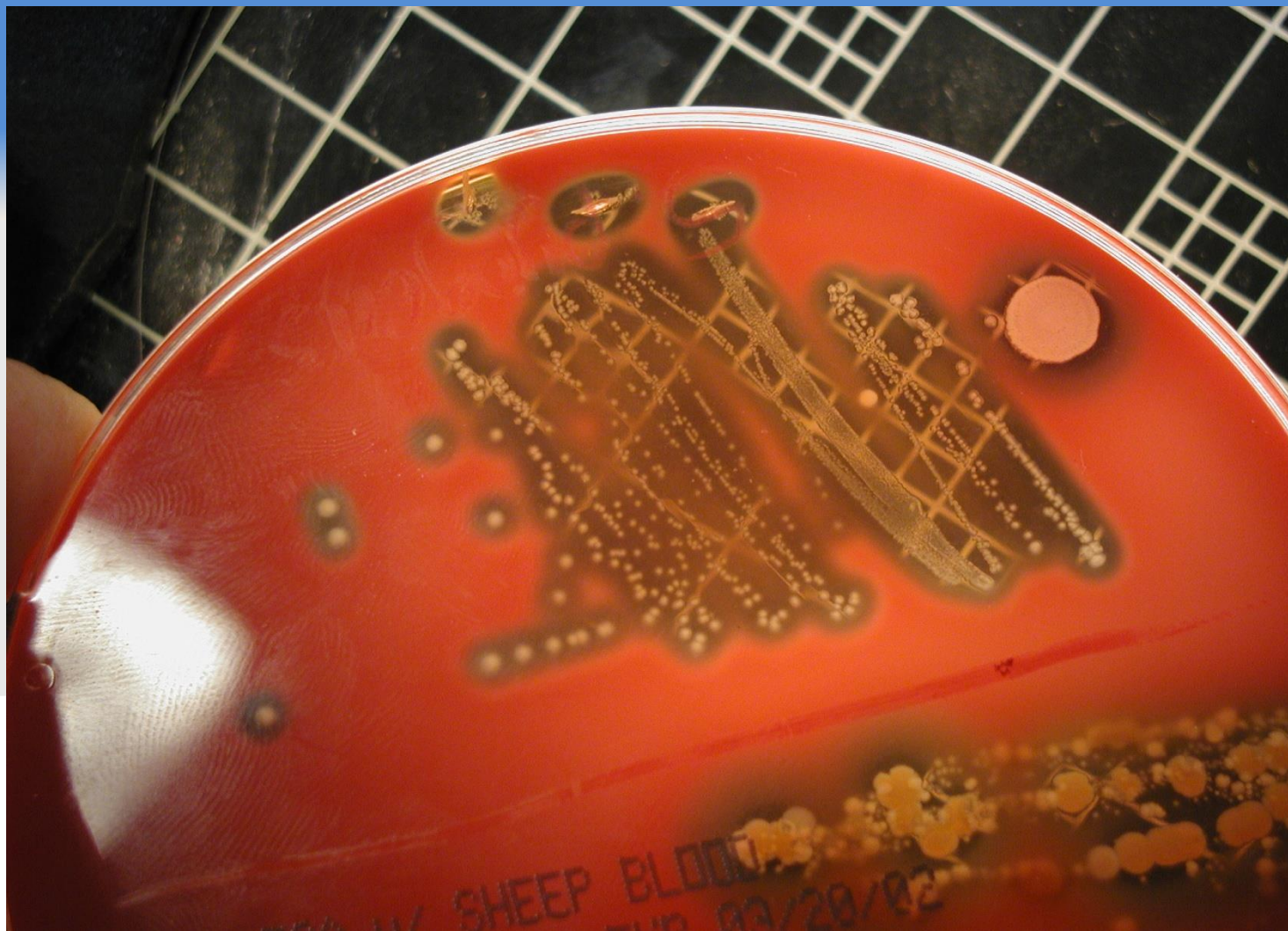


1. β – αιμόλυση η πλήρης
2. α – αιμόλυση η ατελής
3. γ - αιμόλυση

Αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος σε αιματούχο άγαρ



B-αιμόλυση (πλήρης αιμόλυση) σε αιματούχο άγαρ

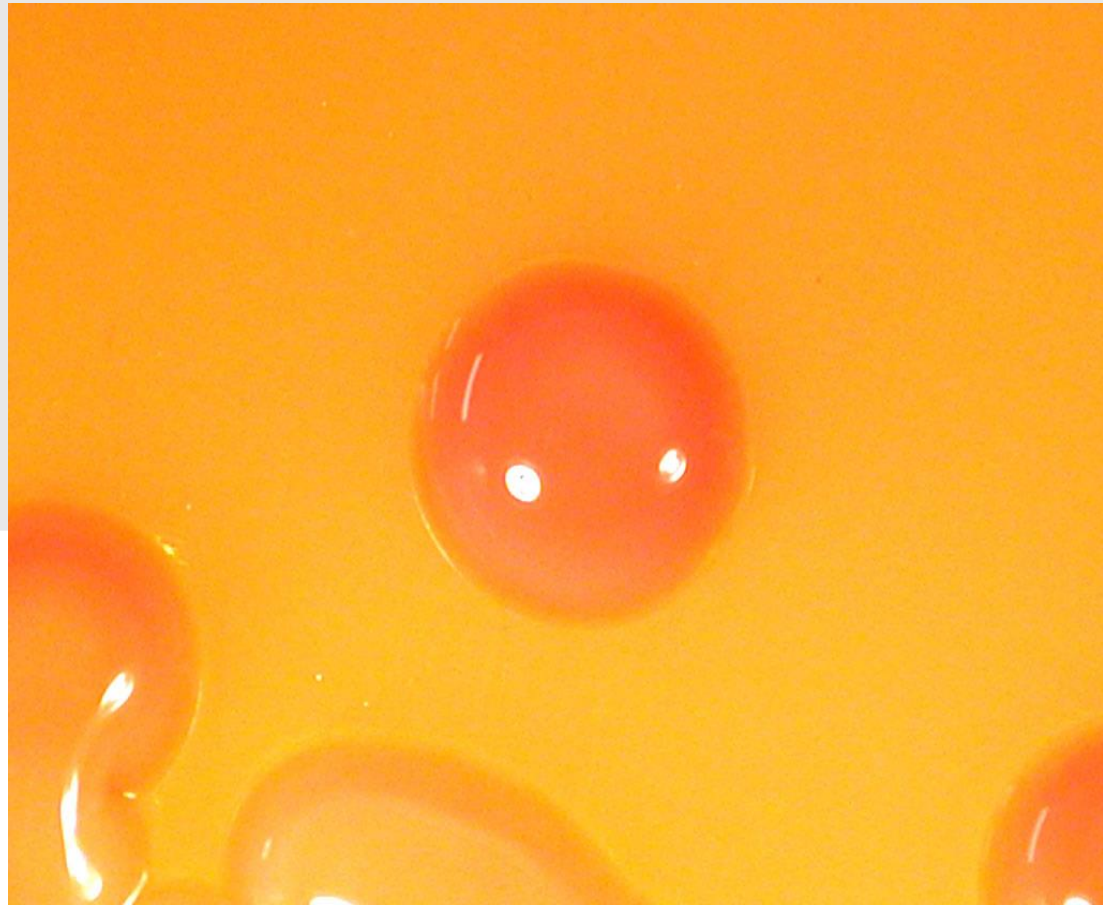


α- αιμόλυση (ατελής αιμόλυση) με χαρακτηριστική πράσινη χροιά γύρω από τις αποικίες

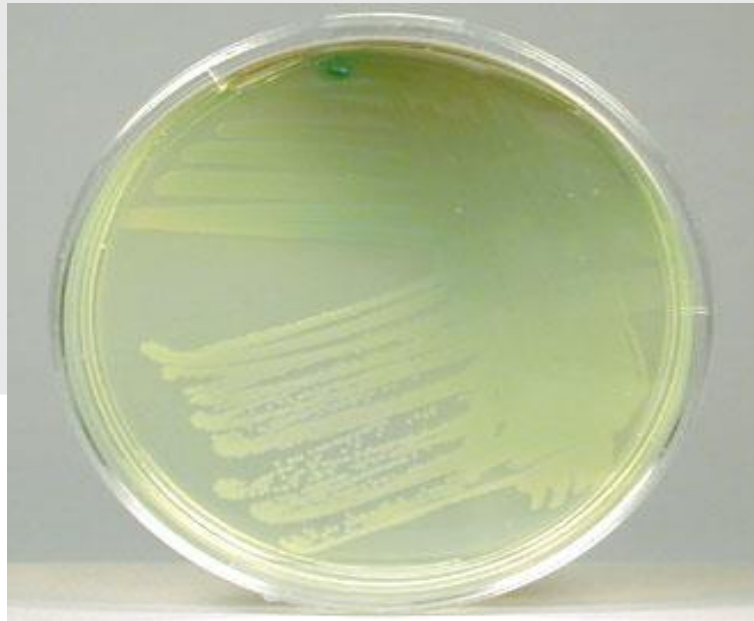
Παραγωγή βλέννας



Pseudomonas aeruginosa



Pseudomonas aeruginosa
(Παραγωγή πράσινης πιουοκυανίνης)



Παραγωγή οσμής

Pseudomonas aeruginosa

- Γιασεμί

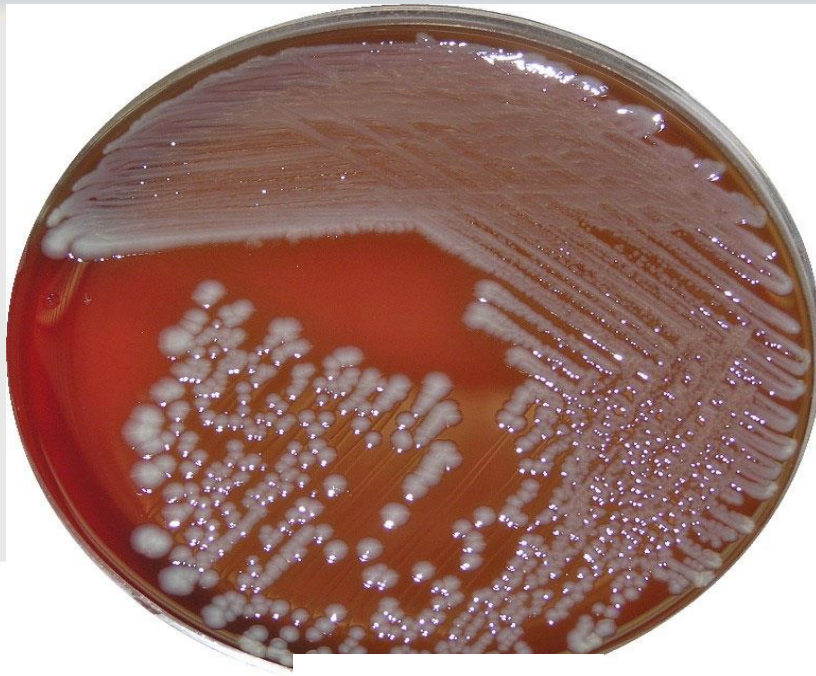
Proteus mirabilis

- Καμένη σοκολάτα

Streptococcus milleri

- Καραμέλα

Συσχέτιση μορφολογίας αποικιών στα διάφορα υλικά



Blood agar



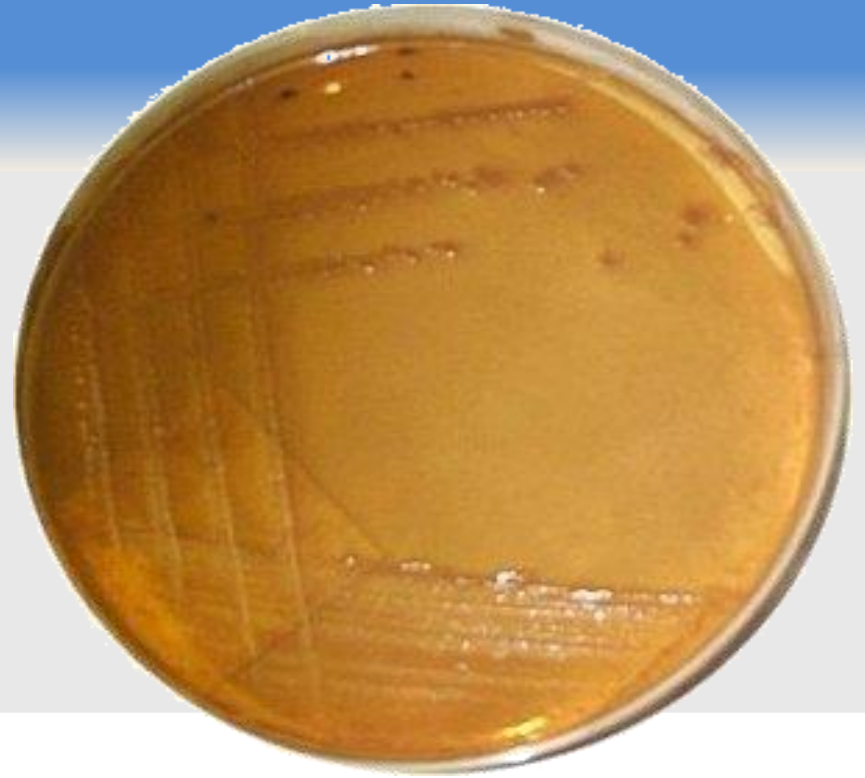
**MacConkey
agar**

E.coli



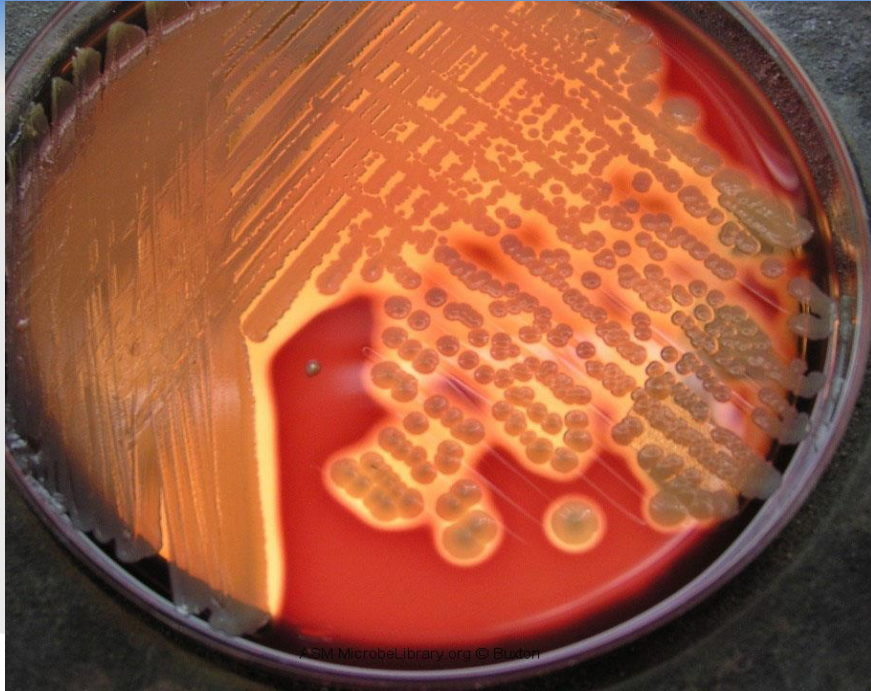
ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

Blood agar

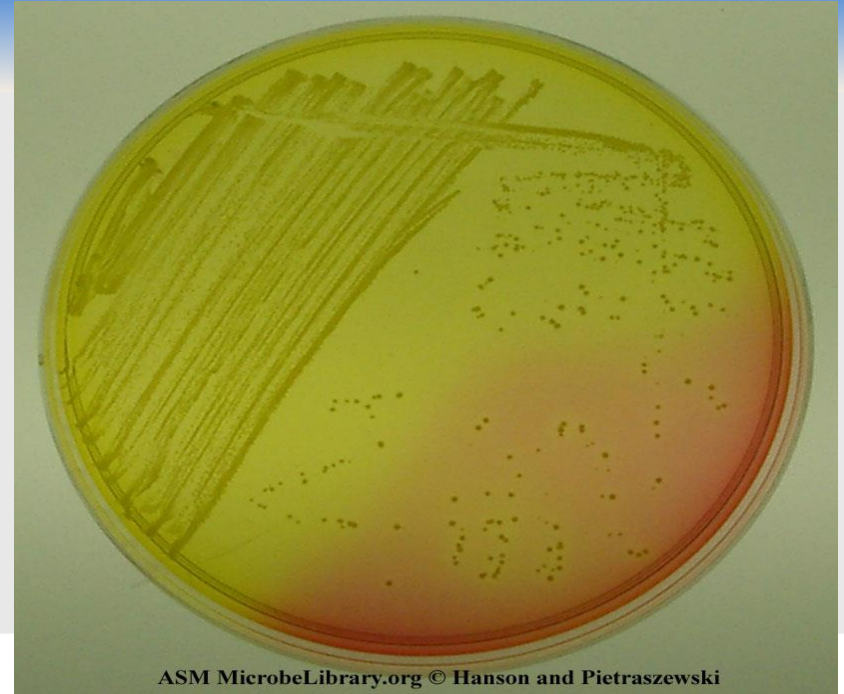


MacConkey agar

Proteus mirabilis



Blood agar

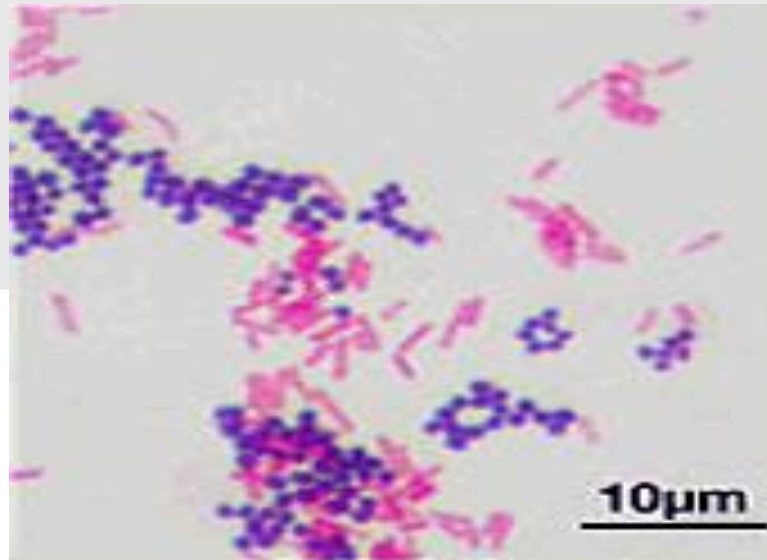


Mannitol salt agar (Chapman)

St. aureus

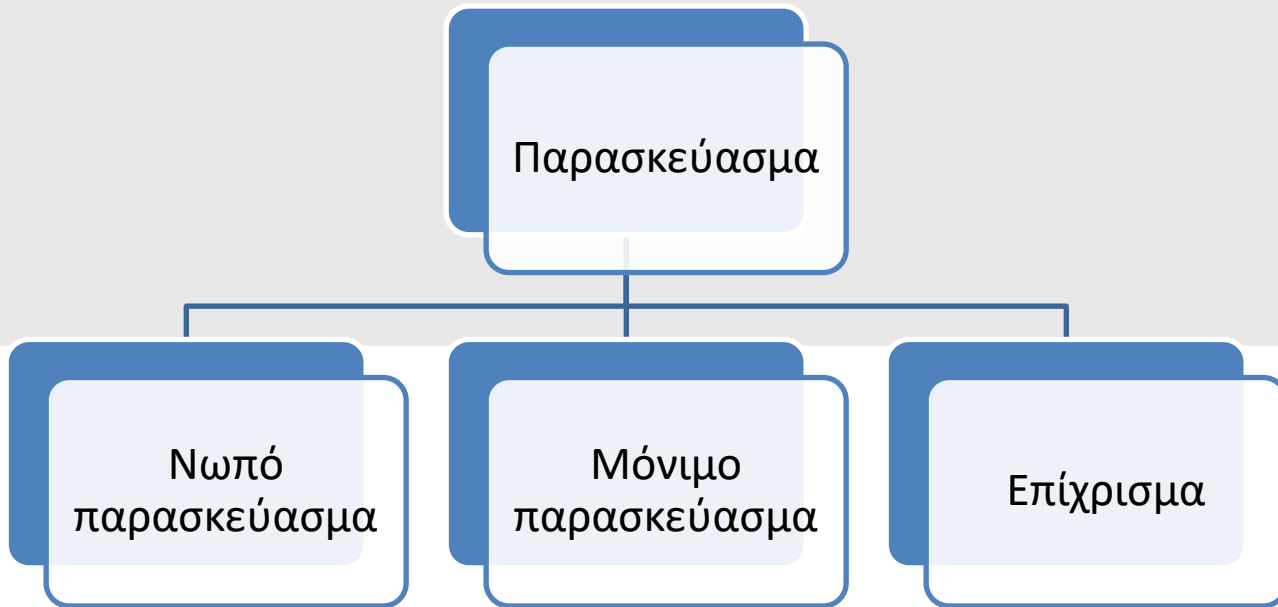
Για την ταυτοποίηση των μικροβίων λαμβάνεται πάντα υπόψη τα συμπτώματα του ασθενούς και το είδος του βιολογικού δείγματος

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ
ΧΡΩΣΕΙΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ



Παρασκευάσματα

Παρασκεύασμα ονομάζεται το αντικείμενο το οποίο παρατηρείται στο μικροσκόπιο



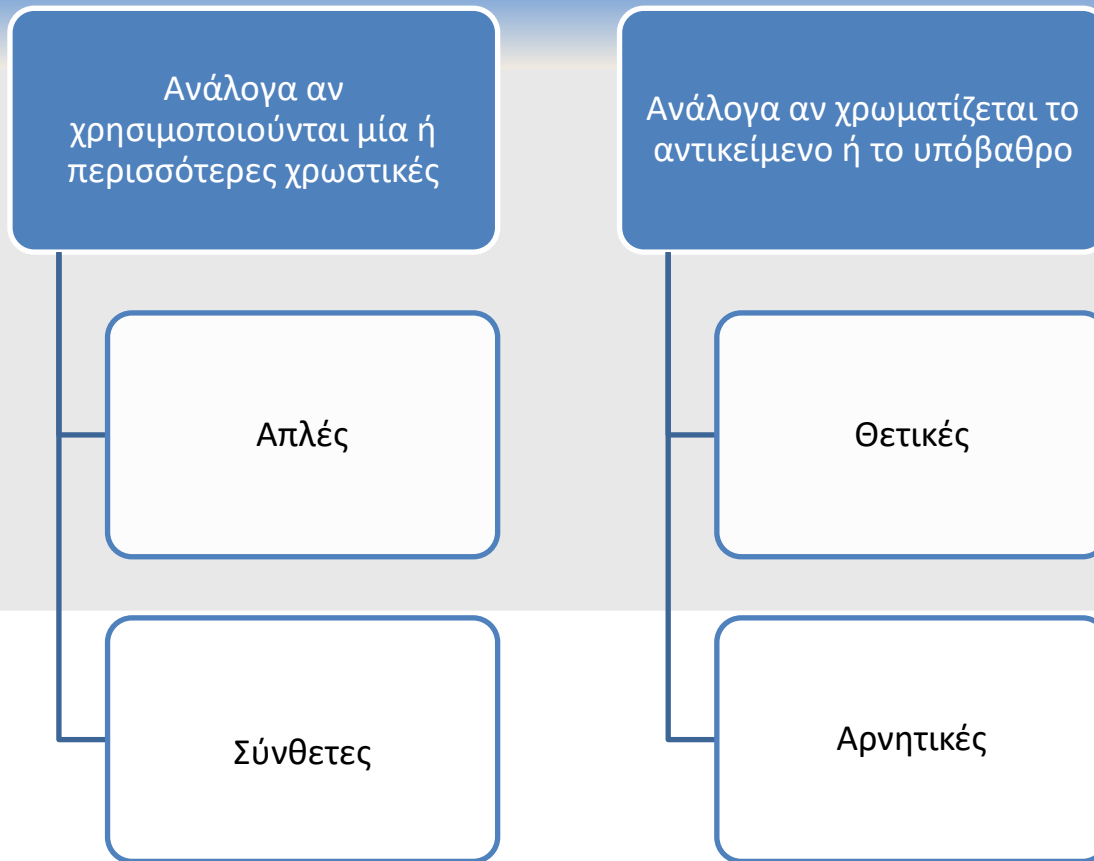
Παρασκεύασμα

```
graph TD; A[Παρασκεύασμα] --> B[Άχρωμο]; A --> C[Κεχρωσμένο];
```

Άχρωμο

Κεχρωσμένο

Διάκριση χρώσεων



Νωπό παρασκεύασμα

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται μία σταγόνα νερού ή φυσιολογικού ορού



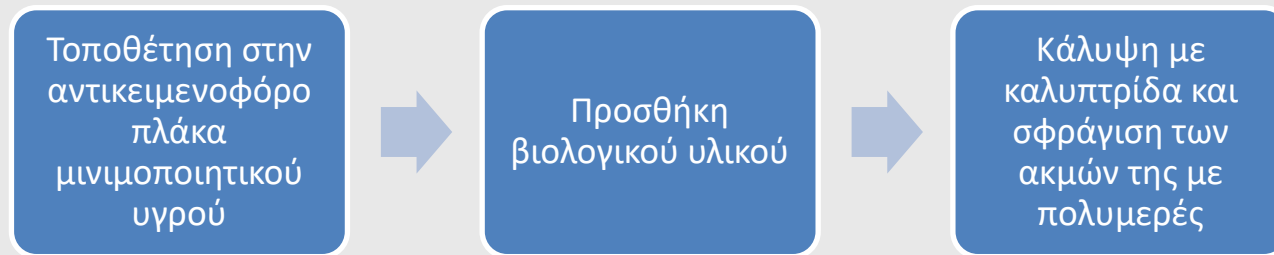
Τοποθέτηση του βιολογικού υλικού και ανάμειξη με το υγρό



Κάλυψη του υλικού με καλυπτρίδα



Μόνιμο παρασκεύασμα

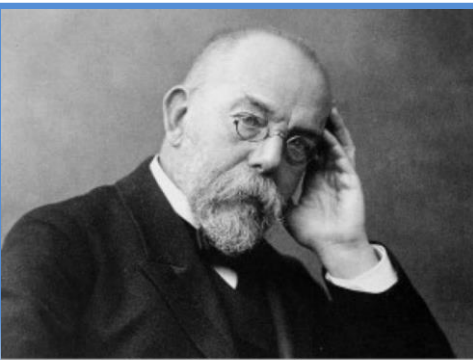


Επίχρισμα

Το βιολογικό υλικό απλώνεται με μικροβιολογικό κρίκο στην αντικειμενοφόρο πλάκα

Το υλικό αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου

Η αντικειμενοφόρος πλάκα διέρχεται τρεις φορές πάνω από φλόγα



Hans Christian Gram



Χρώση Gram

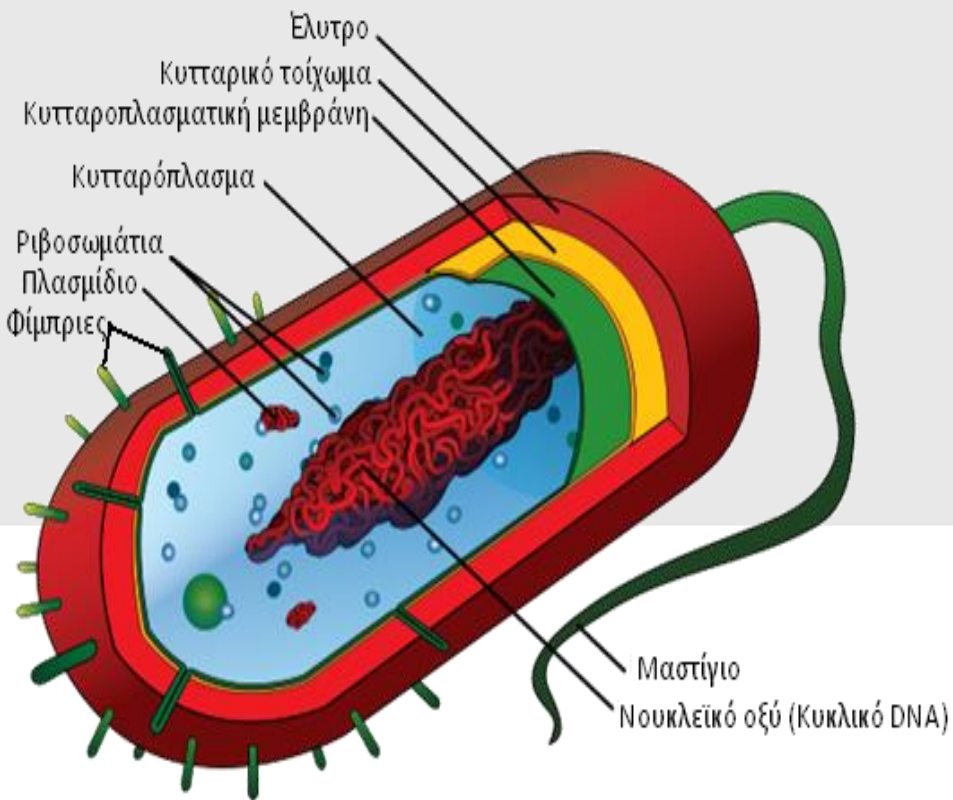
- ▣ **α) Σύνθετη χρώση:** Χρησιμοποιούνται περισσότερες τις μιας χρωστικές
- ▣ **β) Θετική χρώση:** Χρωματίζονται τα μικρόβια και όχι το περιβάλλον.
- ▣ **γ) Διαχωρισμός βακτηρίων:** Όλα τα βακτήρια διαχωρίζονται με τη χρώση σε δύο ομάδες, τα Gram (+) και Gram (-)

- Δανός μικροβιολόγος-βακτηριολόγος
- Το 1884, ανακάλυψε την μέθοδο χρώσης των βακτηρίων, με την οποία τα διέκρινε σε δύο κατηγορίες

Χρώση Gram

- ▣ Εμπειρική χρώση
- ▣ Είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρώση
- ▣ Τα Gram (+) βάφονται ιώδη ενώ τα Gram (-) κόκκινα

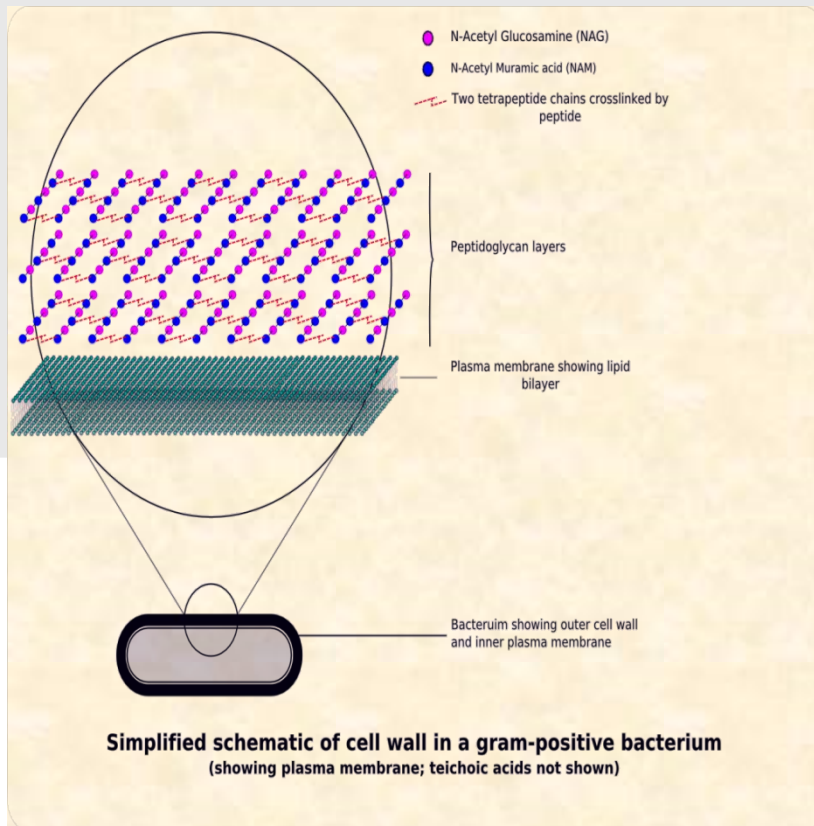




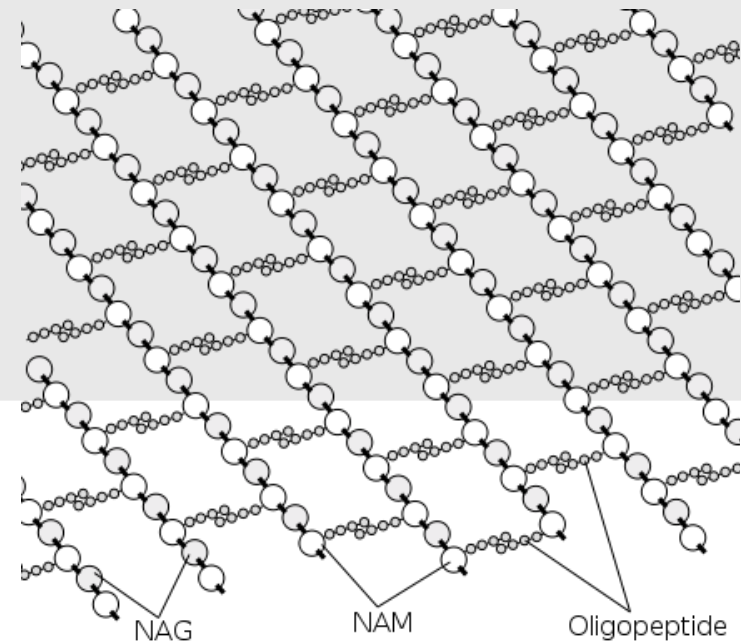
Η διαφορά του χρώματος της τεχνικής οφείλεται σε διαφορές του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

Τα Gram (+) βακτήρια περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από παχιά στιβάδα πεπτιδογλυκάνης, ενώ τα Gram (-) από λεπτή στιβάδα πεπτιδογλυκάνης και ένα παχύ στρώμα λιπιδίων.

Κυτταρικό τοίχωμα Gram (+) βακτηρίων

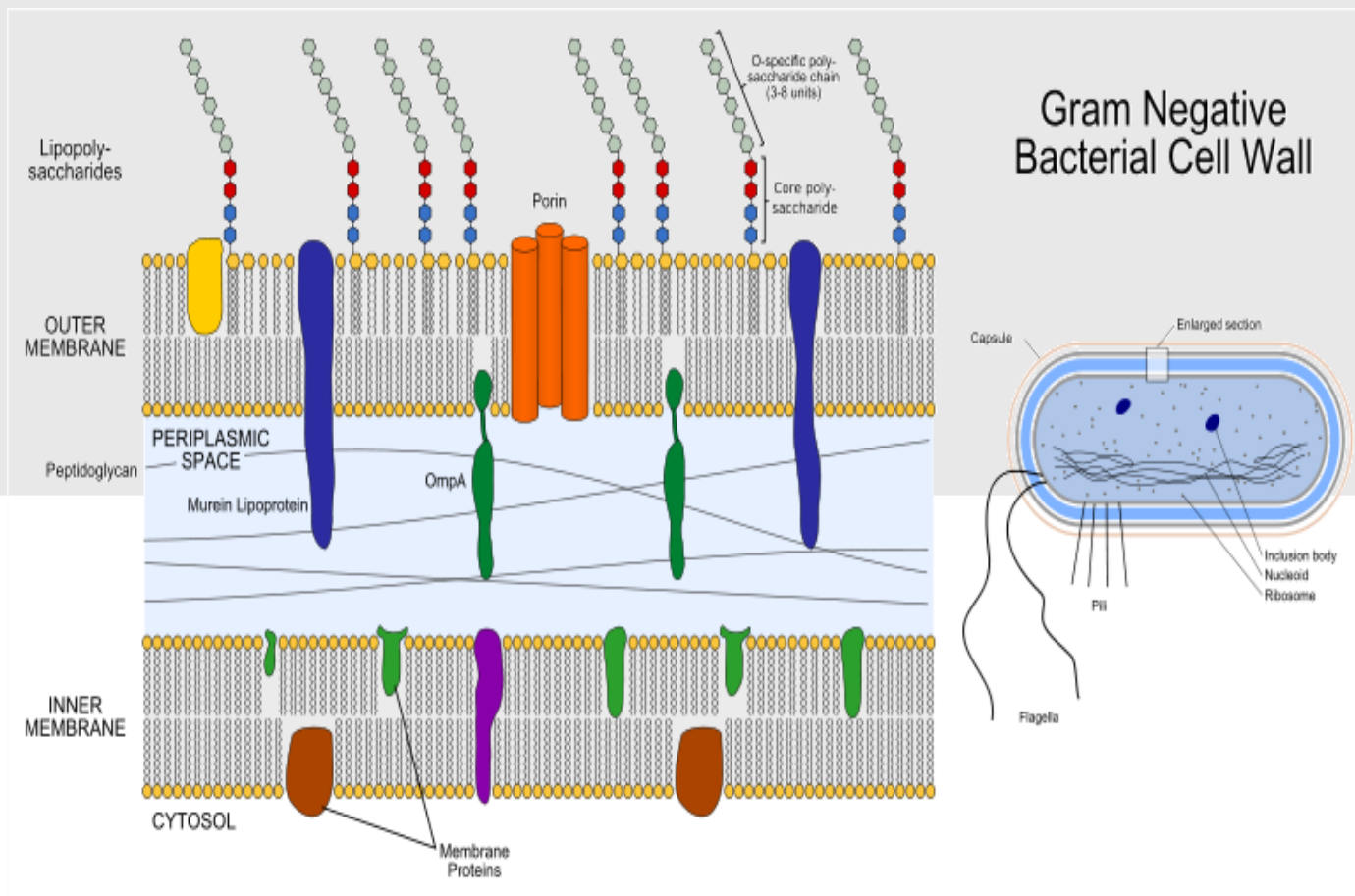


Πεπτιδογλυκάνη (μουκοπεπτίδιο)



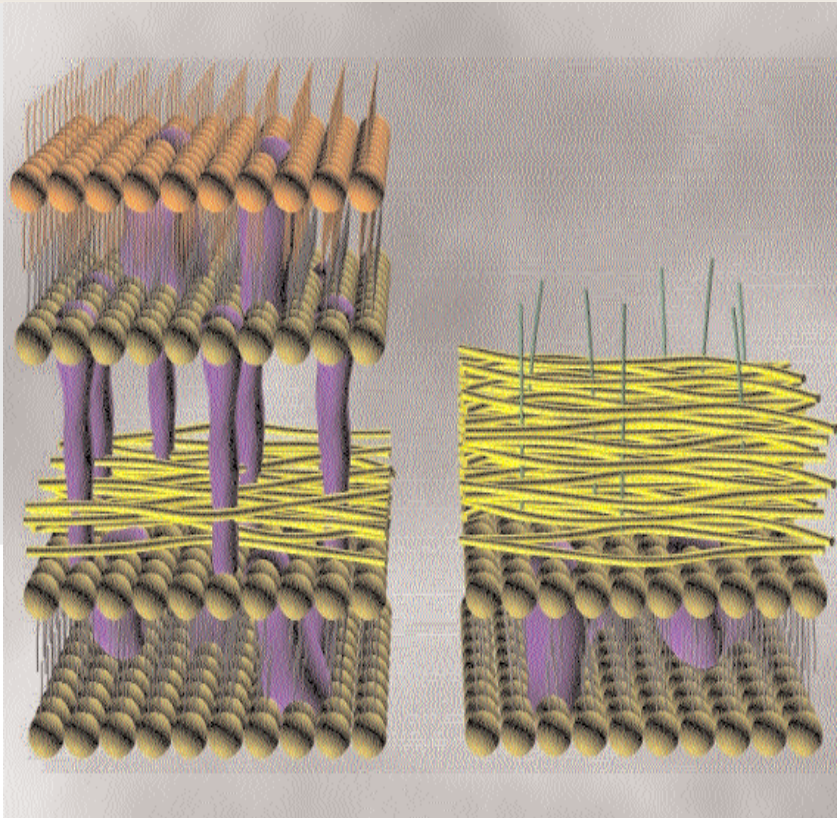
NAG: N-ακετυλογλυκοζαμίνη
NAM: N-ακετυλομουραμινικό οξύ

Κυτταρικό τοίχωμα Gram (-) βακτηρίων



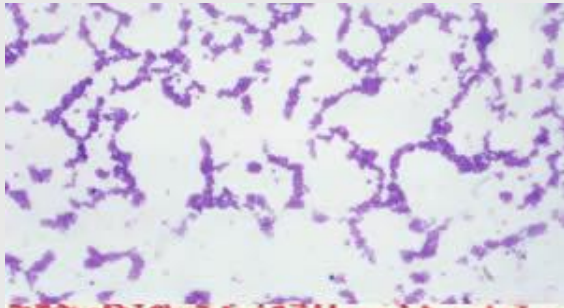
Κυτταρικό τοίχωμα
Gram (-) βακτηρίων

Κυτταρικό τοίχωμα
Gram (+) βακτηρίων

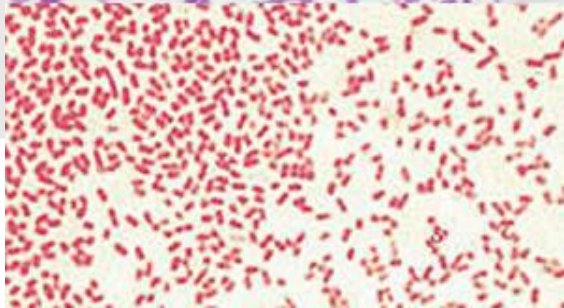


Κίτρινο: πεπτιδογλυκάνη
Μωβ: πρωτεΐνες
Πράσινο: τεϊχοϊκά οξέα
Καφέ: φωσφολιπίδια
Πορτοκαλί: λιποπολυσακχαρίτες

Οι πρώτη χρωστική προσδένεται στο κυτταρικό τοίχωμα και το χρωματίζει. Στη συνέχεια προστίθεται ένας οργανικός διαλύτης ο οποίος διαλύει και απομακρύνει το στρώμα των λιπιδίων των Gram (-) βακτηρίων, με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της διάχυσής του στο περιβάλλον. Αντίθετα, στα Gram (+) βακτήρια ο διαλύτης αφυδατώνει το κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση των πόρων του και την στερέωση της χρωστικής σε αυτό. Έτσι, τα πρώτα κύτταρα αποχρωματίζονται, ενώ τα δεύτερα παραμένουν χρωματισμένα



Gram (+)
βακτήρια



Gram (-) βακτήρια

Οι διαφορές χρωματισμού γίνονται πιο έντονες με την προσθήκη της δεύτερης χρωστικής που βάφει μόνο τα αποχρωματισμένα κύτταρα

Χρώση Gram

Απαιτούμενα υλικά

Πρώτη χρωστική: διάλυμα κρυσταλλικού
ιώδους ή ιώδους της γεντιανής

Ενίσχυση πρώτης χρωστικής: διάλυμα Lugol,
το οποίο συνδέεται με το ιώδιο και ενισχύει
τη χρώση

Αποχρωματισμός: διάλυμα αιθανόλης ή
ακετόνης

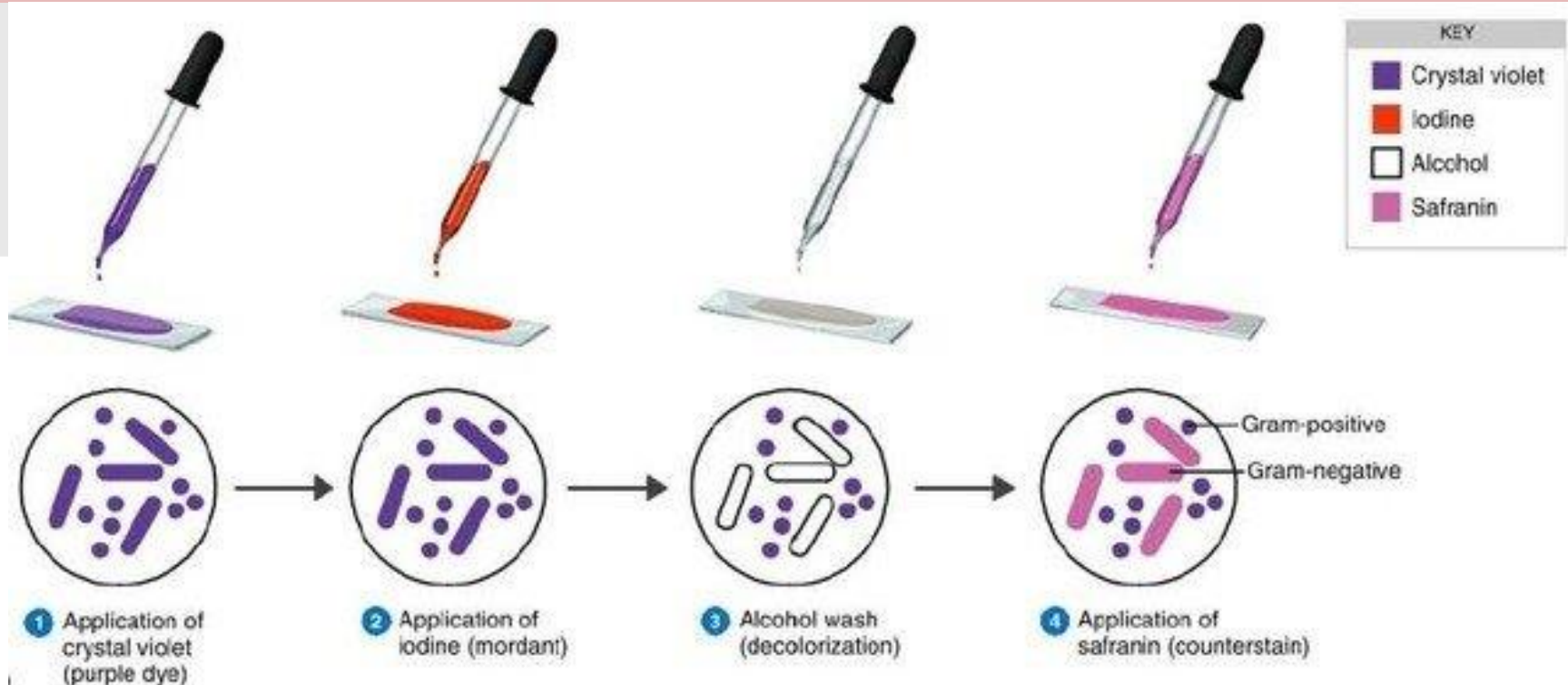
Δεύτερη χρωστική: διάλυμα φουξίνης ή
σαφρανίνης

Το κυτταρικό τοίχωμα και η χρώση Gram

Ο μηχανισμός βασίζεται στις διαφορές της δομής των τοιχωμάτων των gram-θετικών και των gram-αρνητικών βακτηρίων και πώς καθένα αντιδρά στα διάφορα αντιδραστήρια.

- Το κρυσταλλικό ιώδες, η κύρια χρωστική, χρωματίζει και τα gram-θετικά και τα gram-αρνητικά κύτταρα (η χρωστική ουσία περνάει στο κυτταρόπλασμα και των δύο τύπων κυττάρων)
- Ο ιωδιούχος σταθεροποιητής, αναγκάζει τη χρωστική να διαμορφωθεί σε μεγάλους κρυστάλλους που δεν μπορούν να δραπετεύσουν μέσω του τοιχώματος.

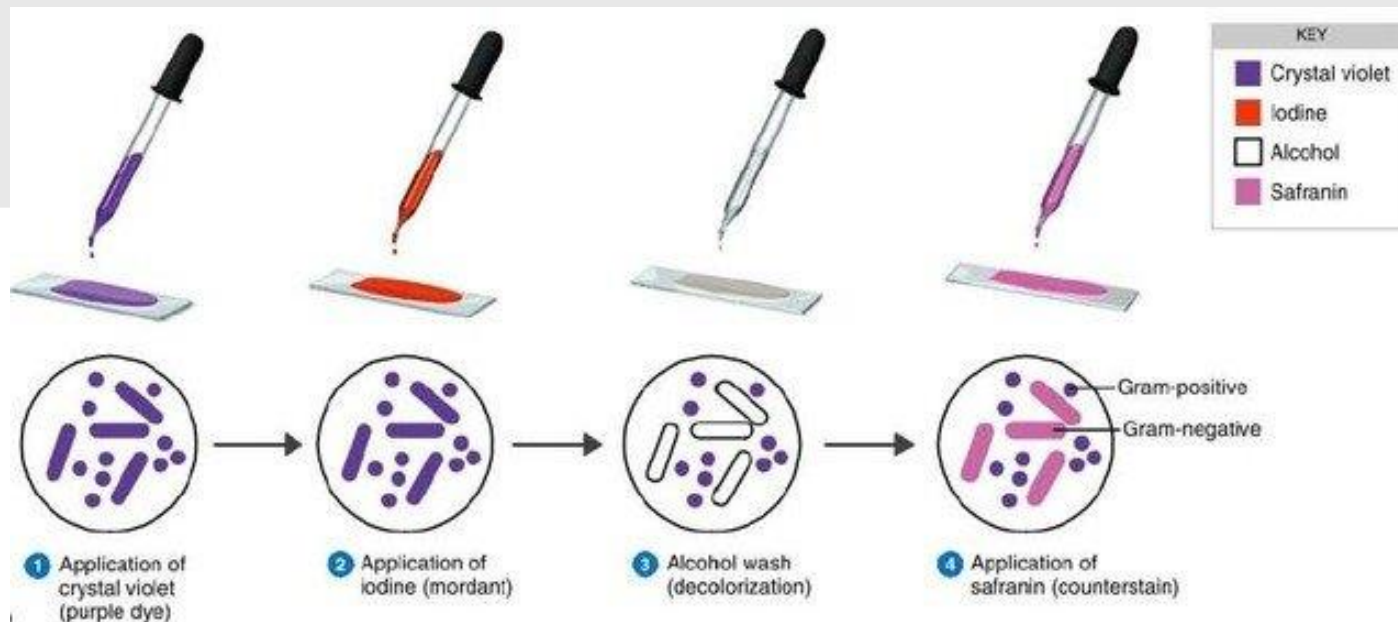
Το οινόπνευμα στη συνέχεια αφυδατώνει και στεγανοποιεί τις πεπτιδογλυκάνες των gram-θετικών κυττάρων.



Το κυτταρικό τοίχωμα και η χρώση Gram

Η επίδραση στα gram-αρνητικά κύτταρα είναι αρκετά διαφορετική

- Το οινόπνευμα διαλύει την εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών κυτάρων και αφήνει μικρές τρύπες στο λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης μέσω των οποίων διαχέεται το κρυσταλλικό ιώδες.
- Τα gram-αρνητικά βακτήρια είναι άχρωμα μετά τον αποχρωματισμό οπότε η προσθήκη σαφρανίνης χρωματίζει ροζ τα κύτταρα.
- Και τα δύο είδη απορροφούν τη σαφρανίνη, ωστόσο στα gram-θετικά το ρόδινο χρώμα καλύπτεται από το σκοτεινότερο ιώδες.



Χρώση Gram

Επίστρωση – ξήρανση –
μονιμοποίηση
παρασκευάσματος



Πρώτη χρωστική:
Κάλυψη
παρασκευάσματος με
διάλυμα κρυσταλλικού
ιώδους για 1-2 min



Ξέπλυμα με νερό και
προσθήκη Lugol για 1
min



Ξέπλυμα με νερό,
στέγνωμα, παρατήρηση
με κερδέλαιο σε
καταδυτικό φακό



Δεύτερη χρωστική:
Ξέπλυμα με νερό και
προσθήκη φουξίνης για
1 min



Αποχρωματισμός:
ξέπλυμα με νερό και
προσθήκη
οινοπνεύματος

Παρατηρήσεις

1

Η επίστρωση πρέπει να γίνεται σε ομοιόμορφη και λεπτή στιβάδα.

2

Η ξήρανση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ποτέ στη φλόγα.

3

Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με το πέρασμα της πλάκας πάνω από τη φλόγα 3-4 φορές.

4

Ο χρόνος και η ποσότητα του διαλύτη είναι πολύ σημαντικό στάδιο. Υπερβολική ποσότητα μπορεί να αποχρωματίσει και τα Gram (+) βακτήρια, ενώ πολύ λίγη ποσότητα να αφήσει βαμμένα και τα Gram (-).

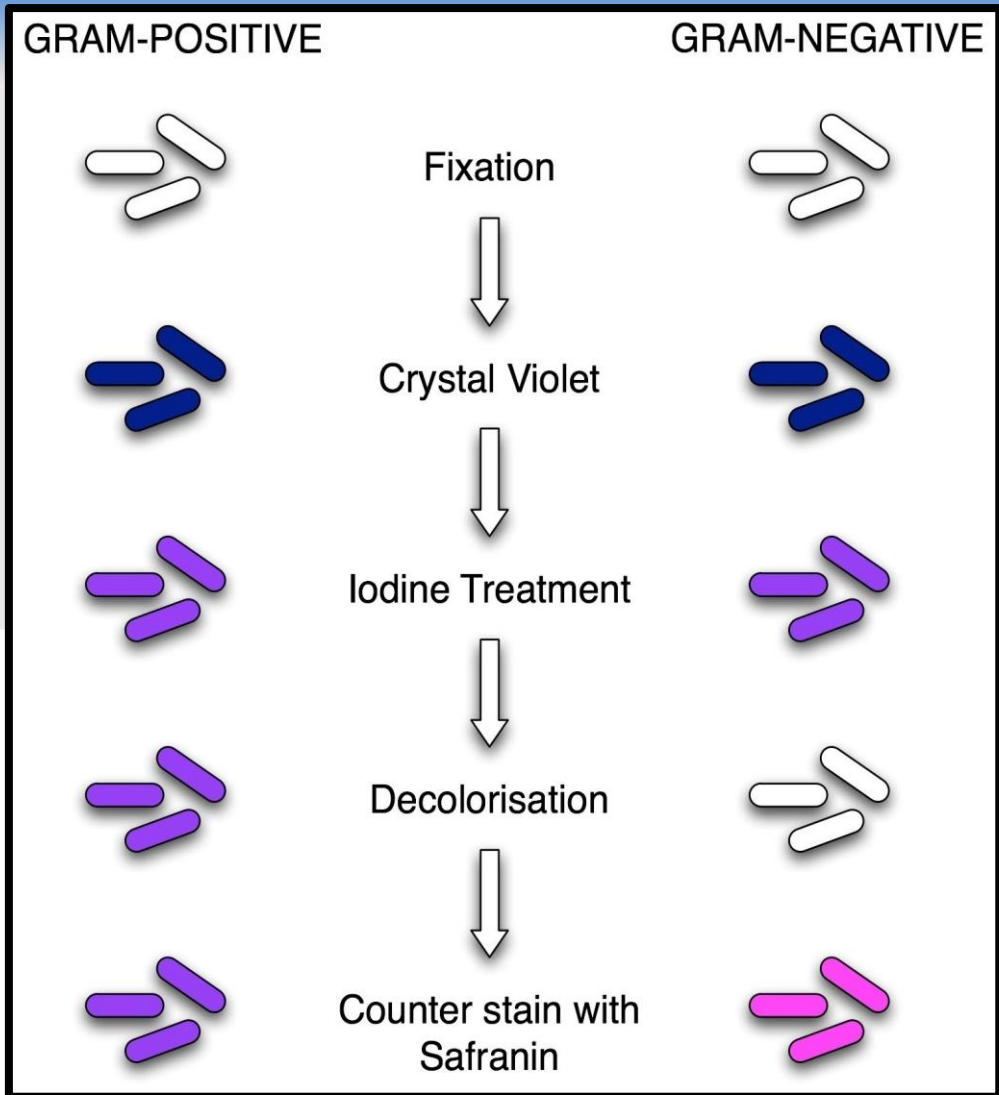
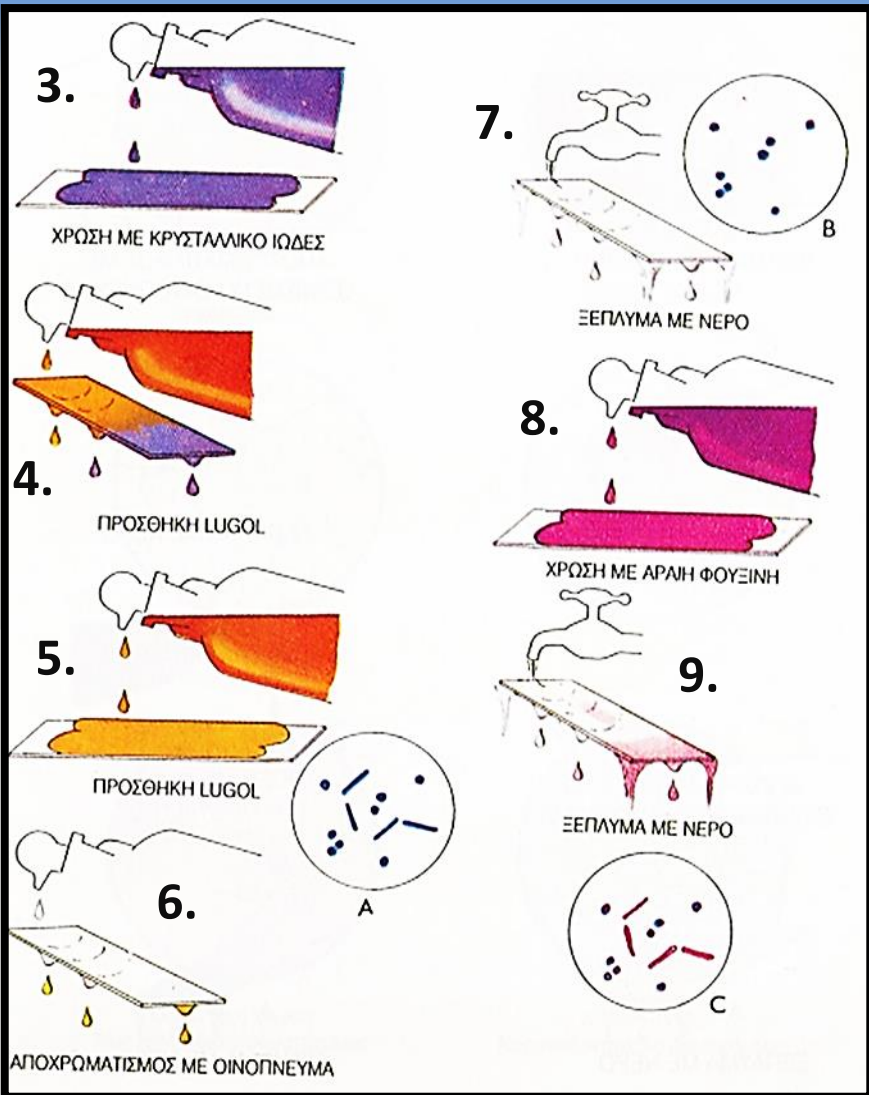


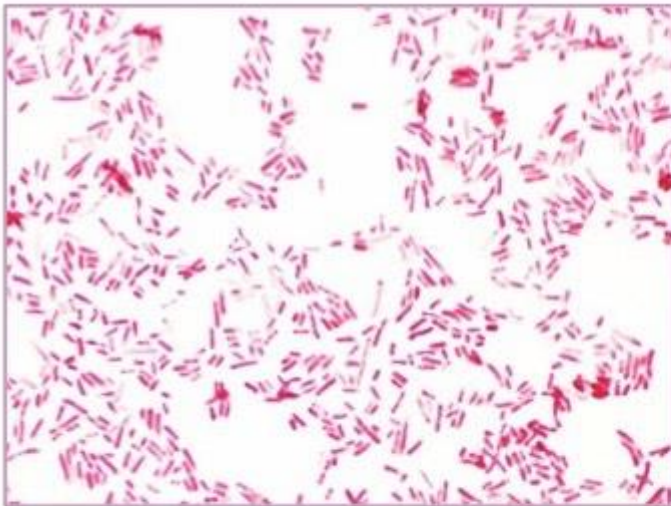
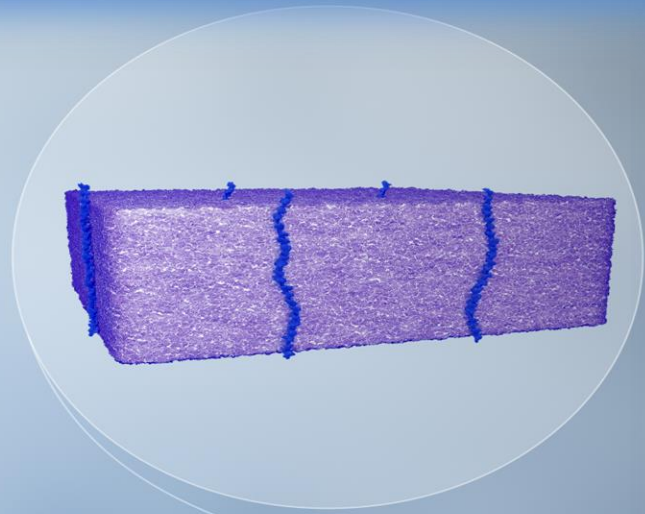
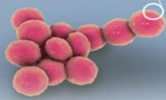
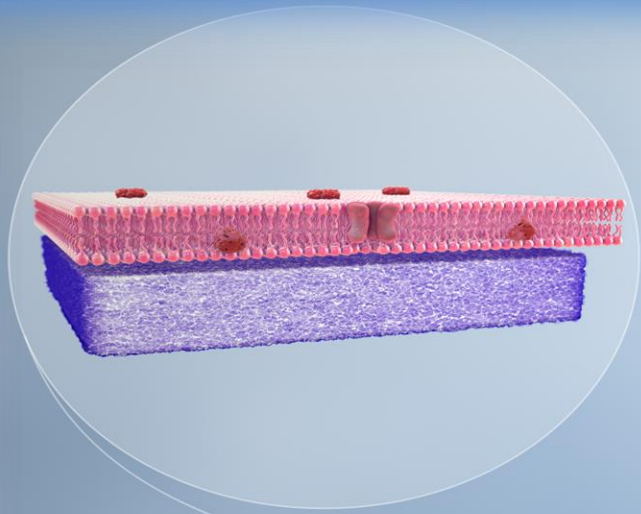
ΧΡΩΣΗ GRAM

Πειραματική διαδικασία

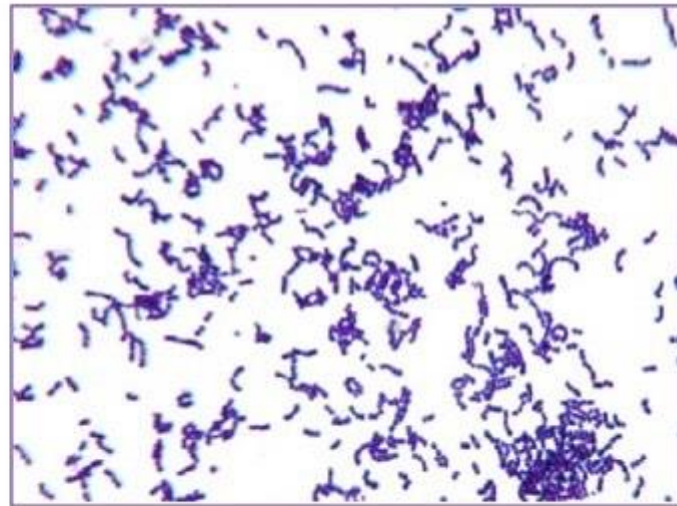


1. Τοποθετείται δείγμα στην αντικειμενοφόρο
2. Στεγνώνεται στον αέρα και έπειτα μονιμοποιείται με την βοήθεια της φλόγας





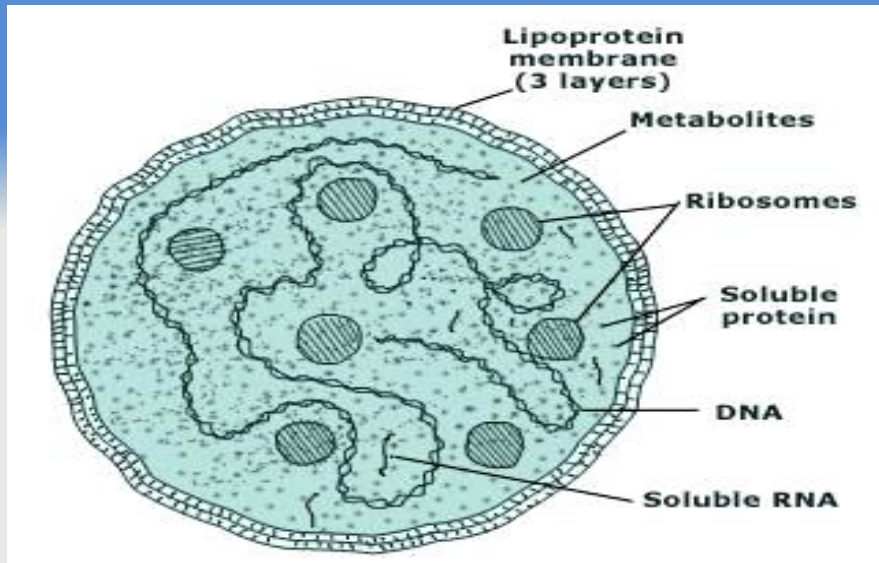
Gram-Negative Bacteria



Gram-Positive Bacteria

Άτυπα κυτταρικά τοιχώματα

Μυκοπλάσματα

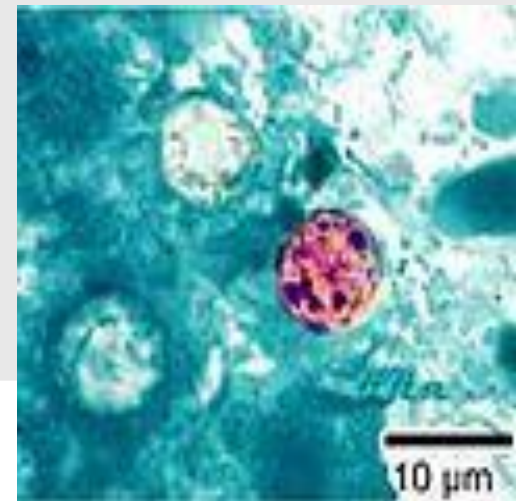


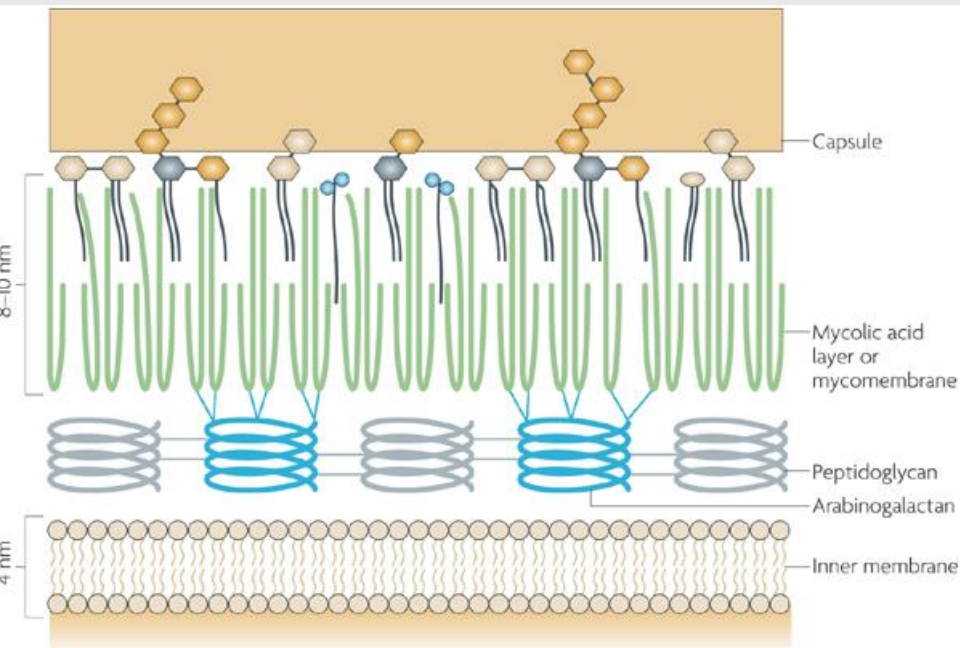
Ορισμένοι τύποι κυττάρων δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα ή έχουν λίγο τοιχωματικό υλικό

- Αυτοί περιλαμβάνουν τα μέλη του γένους *Mycoplasma* και άλλων ανάλογων μικροβίων
- Τα μυκοπλάσματα είναι τα μικρότερα γνωστά βακτήρια που μπορούν να αυξηθούν και να αναπαραχθούν έξω από τα κύτταρα του ξενιστή
- Χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, είναι ανεπηρέαστα από πολλά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, τα οποία στοχοποιούν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- Αρκετά είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο με σημαντικότερο εκπρόσωπο το είδος *M. pneumoniae* που προκαλεί άτυπη πνευμονία και αναπνευστικές διαταραχές.

Χρώση Zielh-Neelsen

- ▣ Σύνθετη χρώση
- ▣ Επινοήθηκε το 1882 από τους Franz Zielh και Friedrich Neelsen
- ▣ Χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα οξεοάντοχα βακτήρια
- ▣ Τα βακτήρια βάφονται κόκκινα
- ▣ Στην Μικροβιολογία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* (φυματίωση!) και την ταυτοποίηση του γένους *Nocardia*





Ορισμένα μικρόβια έχουν υψηλή περιεκτικότητα μυκολικού οξέος στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Όταν η ουσία αυτή χρωματιστεί με ισχυρή βασική χρωστική (π.χ. φοινικούχος φουξίνη) με θέρμανση σχηματίζει ένωση που δεν αποχρωματίζεται με οξέα.

Χρώση Zielh-Neelsen

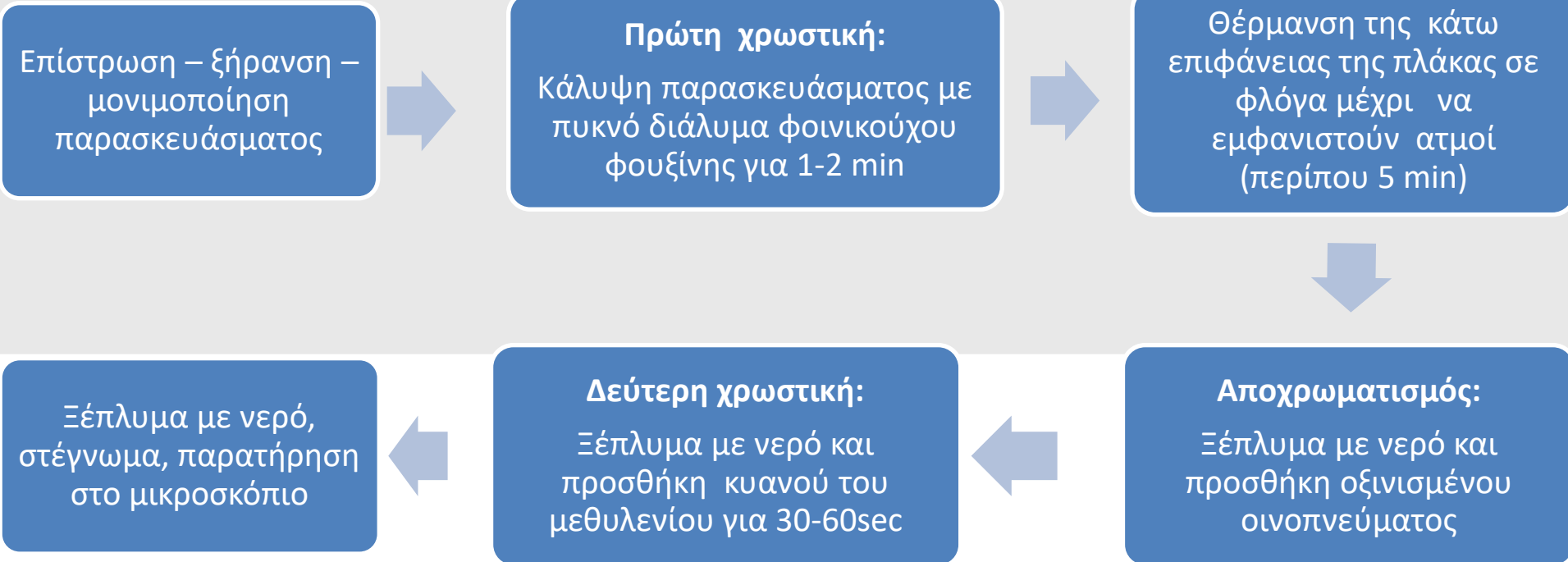
Απαιτούμενα υλικά

Πρώτη χρωστική: πυκνό διάλυμα
φοινικούχου φουξίνης

Αποχρωματισμός: οξυρισμένο οινόπνευμα

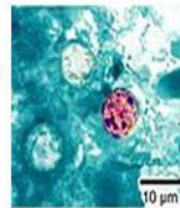
Δεύτερη χρωστική: διάλυμα κυανού του
μεθυλενίου

Χρώση Zielh-Neelsen

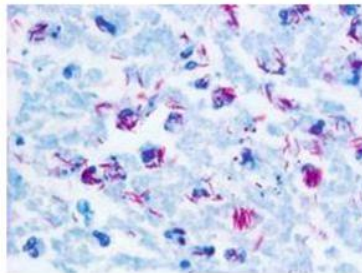


Τεχνική χρώσης κατά Zielh–Neelsen

- Μονιμοποίηση παρασκευάσματος με μεθανόλη ή με θέρμανση
- Κάλυψη παρασκευάσματος με πυκνή φαινικούχο φουξίνη
- Θέρμανση της κάτω επιφάνειας του παρασκευάσματος με φλόγα μέχρι να εμφανιστούν ατμοί 5 min
- Ξέπλυμα με νερό αφού κρυώσει για 5 min
- Αποχρωματισμός με οξυρισμένο οινόπνευμα 15-20s
- Ξέπλυμα με νερό
- Μεταχρωματισμός με κυανό του μεθυλενίου 1 min
- Ξέπλυμα με νερό
- Στέγνωμα-Μικροσκόπηση
- Για τη μικροσκόπηση απαιτούνται τουλάχιστον 30 min



Cyclospora



Τα οξεάντοχα βακτήρια χρωματίζονται κόκκινα

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ- ΧΡΩΣΗ ZIEHL-NEELSEN

