

A mikroorganizmusok morfológiája, mikroszkópos vizsgálatok

Kanizsai Szilvia

Mikrobiológia felosztása

- 1) **Bakteriológia:** baktériumok, prokariota élő sejtek, 0,3-30 μ m
- 2) **Viroológia:** vírusok: fehérje + nukleinsav, önálló életre képtelen struktúra, gazdasejtre van szüksége, 20nm-400nm
- 3) **Mikológia:** gombák: 3-15 μ m méretűek eukariota, egy vagy többsejtűek
- 4) **Parazitológia** → 5) **protozoológia:**
eukarioták 1-2 μ m → 60-80 μ m
trophozoid, cysta alak
- 6) **helmintológia:** férgek akár 30 m, petéket ürítenek 20-30 x 50-60 μ m
- 7) **Prion:** (protein only) csak fehérjékből állnak



Rendszertani kategóriák

Domén

Ország (regnum)

Törzs (phylum)

Osztály (classis)

Rend (ordo)

Család (familia)

Nemzetség (genus)

Faj (species)

Carl von Linne – binominális elnevezés

pl.: *Staphylococcus aureus*

Prokariyota és eukaryota sejtek összehasonlítása

	Prokaryota	Eukaryota
Méret:	0,3-30 µm	1-100 µm
Fejlődés:	gyorsabb	lassabb
Anyagcsere:	anaerob vagy aerob	aerob (anaerob – gomba)
Légzés:	saját	mitokondrium
Mozgásképesség:	mozgásképtelenek, csilló, ostor, csúszó mozgás	meghatározott szerkezet, álláb
Sejtfal:	cukor, szénhidrát, fehérje	cellulóz, kitin (gombák!), máshol nincs
Sejtmembránban:	magasabb fehérje tart.,hopanoidok	szteránvázas vegyületek
Belső membránrendszer:	nincs	van
Membráninvaginációk:	mezoszóma	nem jellemző
Sejtorganellumok:	nincsenek	ER, Golgi, színtest, mitokondrium,
Citoplazmaáramlás:	nincs	van, mikrotubulus és mikrofilament rendszer
Szaporodás:	hasadással, bimbózás	mitózis, meiózis
Nukleáris állomány:	nukleoid cirkuláris, hiszton <u>szertű</u> fehérjék (kiv. <i>Borellia burgdorferi</i> , egyes Streptomycesek)	nukleusz lineáris, hisztonfehérjék
Intronok:	nincs (1-2 kivétel)	van
Sejtváz (Cytoskeleton):	nincs	van
Riboszómák:	70S (30S + 50S)	80S (40S + 60S)
mRNS képződése:	közvetlenül a génekről azonnali transzláció	a DNS hosszabb szakaszáról RNS képződik, érés folyamat után lesz mRNS
TCA:	citoplazma membránban	mitokondriumban



Baktériumok

Prokariota élő sejtek, 0,3-30 μ m

Obligát sejtalkotók:

- **Cirkularis DNS, superheliakális** (kiv. *Borellia burgdorferi*, egyes Streptomycesek)
- **Citoplazma, benne riboszómák**
- **Citoplazma membrán**
- **Sejtfal** (kivétel: *Mycoplasma*ák, *Ureaplasma*ák)

A baktériumok járulékos alkotó elemei

-Tok: polysacharid, *Bacillus anthracis*: poli-D-glutaminsav, mucoid jellegű, virulencia faktor, védelem funkciója, antifagocita funkció, adhézió a gazdaszerveztben. (mikrokapszula, extracelluláris nyák, glikokalix)

Kimutatás: tok festés

pl.: *Streptococcus pneumoniae* (kimutatás: Quellung–tokduzzadási reakció)

-Csilló: fehérje szerkezetű, mozgás funkcióját látja el. (ccw, G⁻⁴, G⁺²)

Kimutatás: csilló festés, táptaljon rajzás

pl.: *Proteus vulgaris*

-Fimbria: fehérje szerkezetű, funkciójuk szerint:

- kitapadás gazdaszerveztben – adhéziós fimbriák
- génátvitelben – sex pilusok

Kimutatás: szerológiai reakcióval

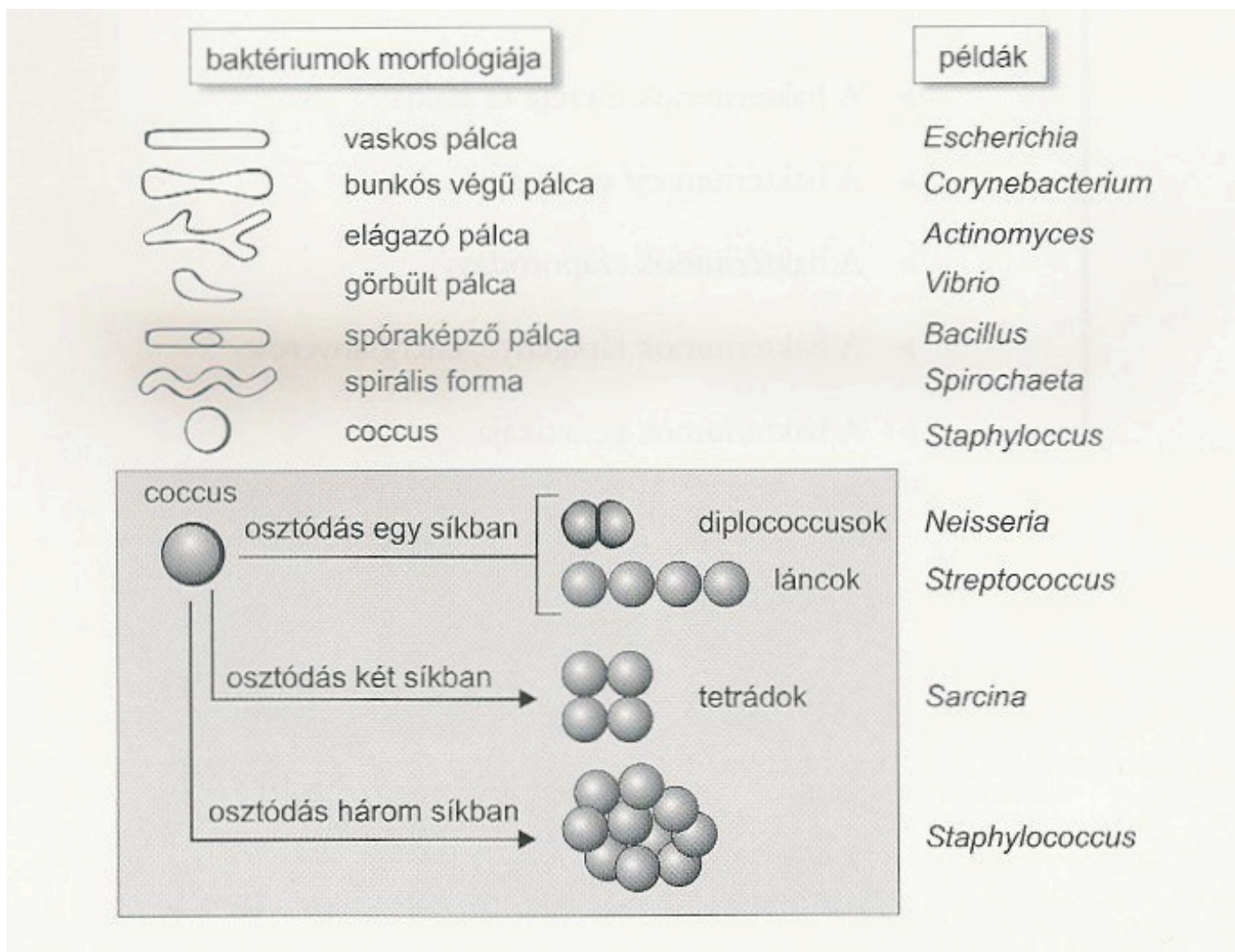
pl.: *Neisseria gonorrhoeae*

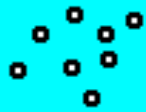
-Spóra: néhány baktérium kedvezőtlen pH, hőmérséklet, tápanyag hiányában spórát képeznek, így vészeli át ezt az időszakot. Ha ismét kedvező környezetbe kerülnek vegetatív alakká válnak.

Kimutatás: spóra festéssel

pl.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus stearothermophilus*

Baktériumok alakja





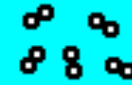
Coccus



Streptococcus



Staphylococcus



Diplococcus



Tetrad



Sarcina



Bacillus



Diplobacillus



Streptobacillus



Coryneform
Bacillus



Spirillum

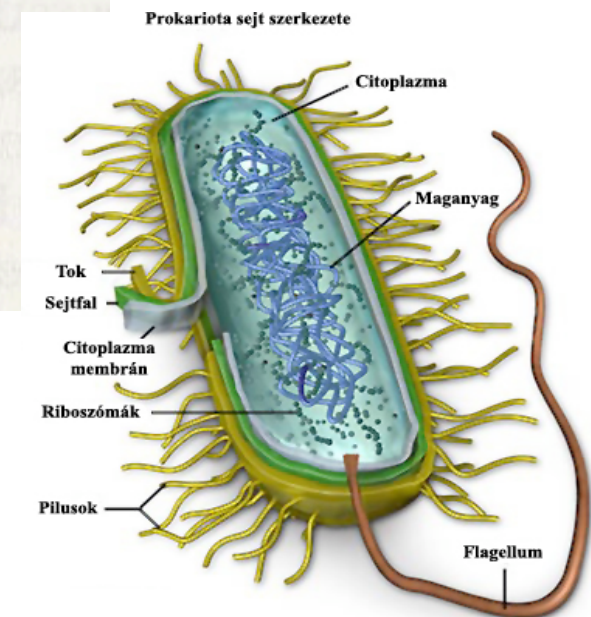
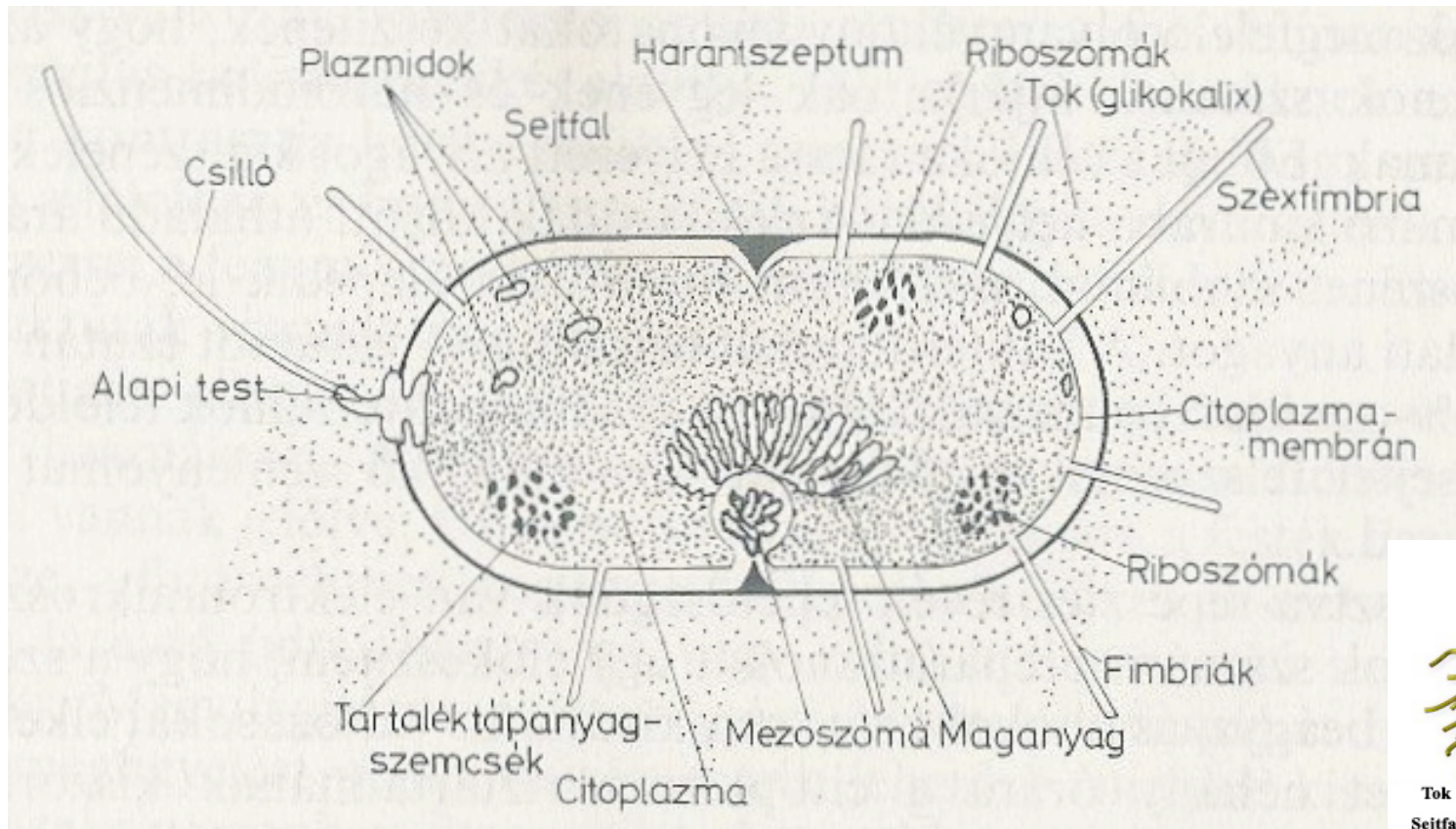


Vibrio

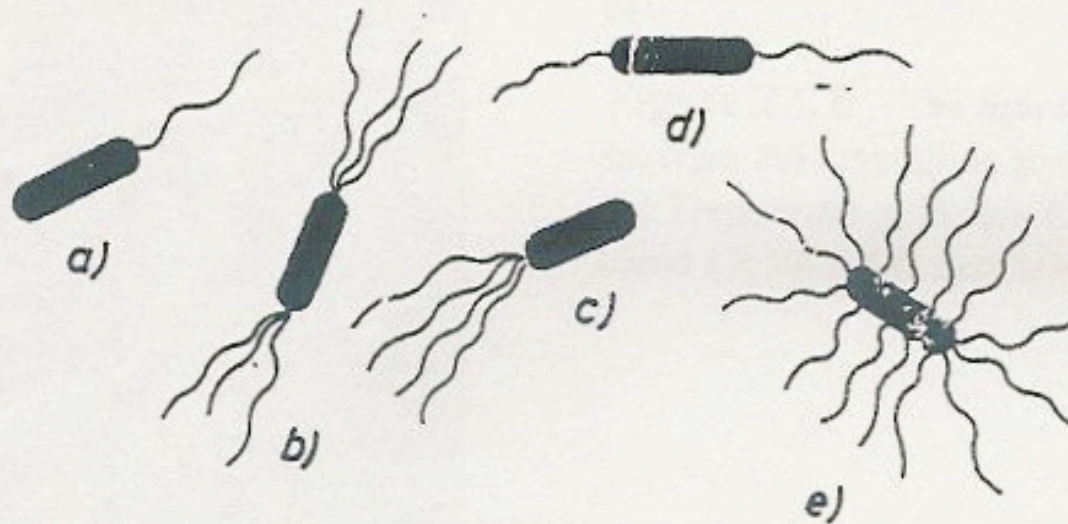


Spirochete

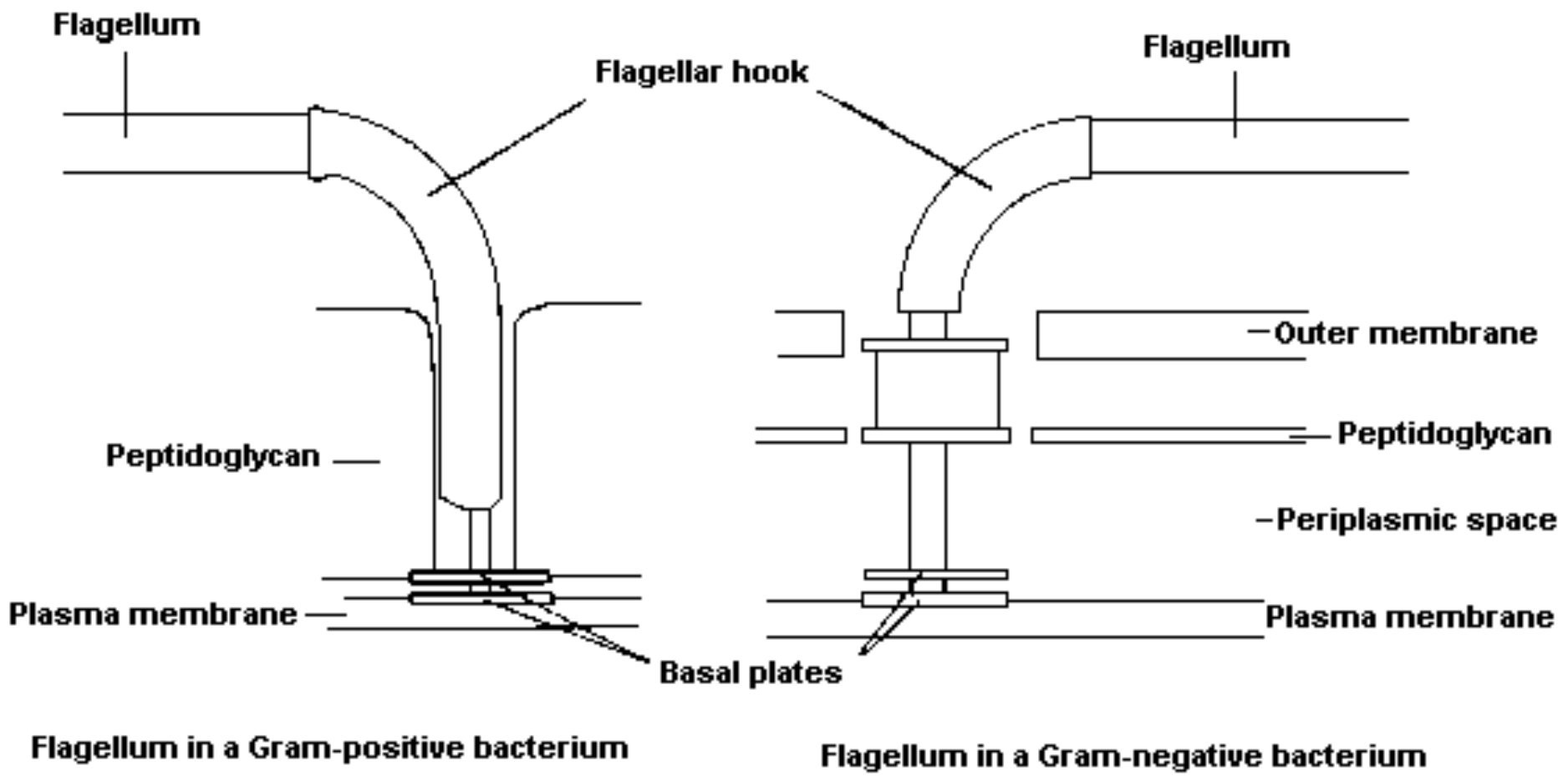
A baktériumsejt szerkezetének vázlatja



A csillózat típusai



A csillózat típusai: a) *Monotrich*, b) *Lcfo-amfitrich*, c) *Lofotrich*, d) *Amfitrich*, e) *Peritrich*



Flagellum in a Gram-positive bacterium

Flagellum in a Gram-negative bacterium



Mikroszkópos vizsgálatok

1. Fénymikroszkóp

felbontó képesség: **250nm**

(az a legkisebb távolság, amellyel elválasztott szerkezeti részletek még különállónak látszanak)

- maximális nagyítás: 1000-1500 X olaj immerzióval
- ⇒ baktériumok, gombák, protozoonok vizsgálatára

Natív készítmények: baktériumok kimutatása – vizelet, liquor, stb,
protozoonok vegetatív formái és cystái székletben,
gombaképletek bőrön,
vírusok cytopathológiai hatásai sejttenyészeteken.

Festett készítmények: Jobb megfigyelhetőség érdekében.

Egyszerű vagy összetett festési eljárások.

2. Sötétlátóteres mikroszkóp

* speciális kondenzor → „sötét háttér” az élő, mozgó baktériumok alakja felcsillan ⇒

Spirochéták vizsgálatára

(treponema, borrelia, leptospira), keskenyebbek, mint a normál fénymikroszkóp felbontóképessége



A sötétlátóteres mikroszkópban jól megfigyelhető az egyes mikroorganizmusok, pl. Spirochaeták mozgása



3. Fáziskontraszt mikroszkóp

Főként kutatási célokra használatos.

A fáziskontraszt eljárással kapott kép különösen jól használható szövettényészetben az alaphoz letapadt, elvékonyodott sejtek, valamint nagyon vékony (0,1-1 μm) festetlen metszetek vizsgálatára.



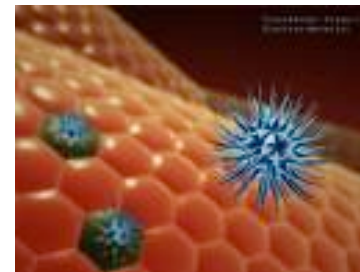
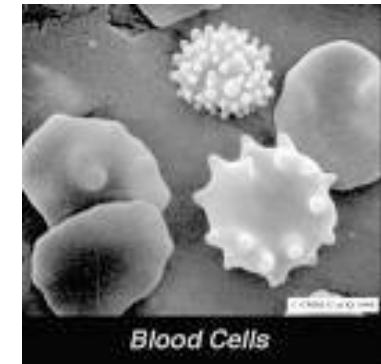
4. Elektron mikroszkóp

- transzmissziós elektron mikroszkóp
- scanning elektron mikroszkóp
- elektron sugarakat használ
- lencse: elektromágneses erő
- energia: gyorsított elektronok 50-1000KV

felbontó képesség: 0,1 nm

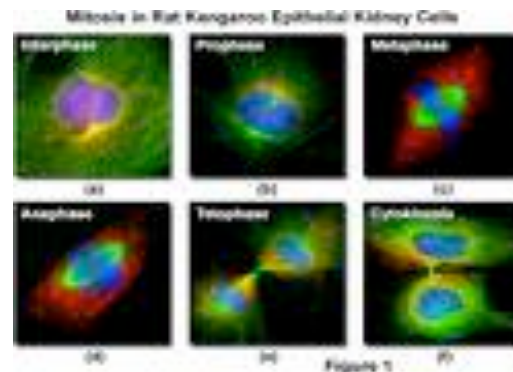
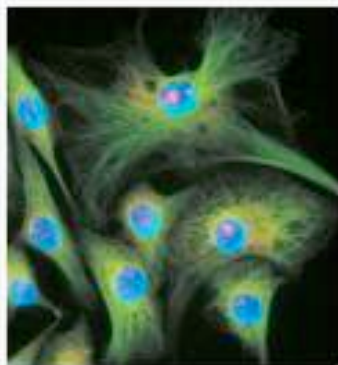
maximális nagyítás: 500 000X

⇒ vírusok



5. Fluoreszcens mikroszkóp

Fluoreszkáló festékekkel konjugált ellenanyag segítségével detektálhatók a különböző mikrobiális antigének.



Használt eszközök

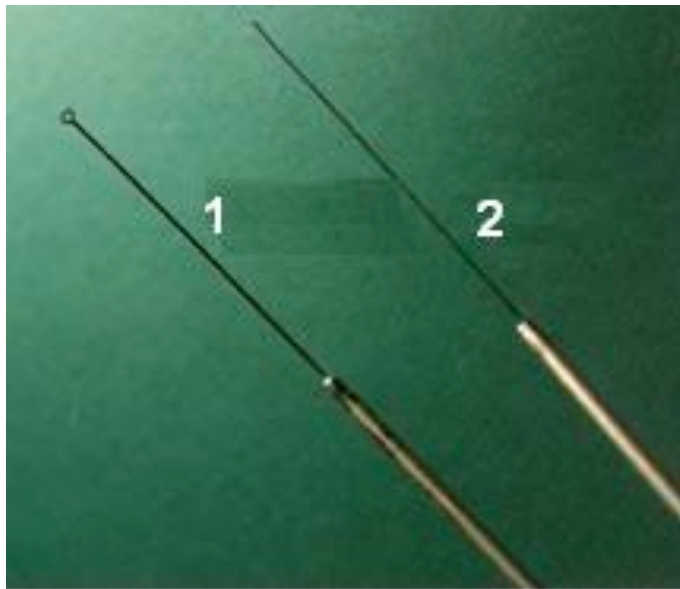
Tárgylemez:

Mindig tiszta, zsírtalanított.

- Bunsen égő lángja felett 2-3-szor áthúzzuk a Cornet-csipeszbe fogott tárgylemezt.

Oltókacs (oltótű)- Sterilizálása lángban égetve izzásig, majd használat előtt időt hagyva a lehűlésre

Minden használat után (és előtt) sterilizáljuk a kacsot!



Oltókacs (1), oltótű (2)



A kacs helyes leégetése



Natív készítmények

- **Élő mikróbák vizsgálata**
(baktériumok, gombák, protozoonok, féregpeték)
- **betegből vett mintában jelen vannak-e**
- **nagyság**
- **alak**
- **mozgás**
- **belső szerkezet**
- **metabolizmus**
- **szaporodás**



Natív készítmények

A) Lapos csepp

- **folyékony szuszpenzióból tárgylemez közepére egy cseppnyit helyezünk kaccsal vagy pipettával vagy**
- **tárgylemezre cseppentett steril fiziológiás sóoldatban szuszpendáljuk a szilárd tenyészetből kaccsal felvett kis mennyiségű mikroorganizmust és jól elszuszpendáljuk**
- **fedőlemezzel lefedjük**
- **süllyesztett kondenzorral, szűk diafragmával, kis nagyításon (40X max.) vizsgáljuk**



Natív készítmények

B) Függőcsepp

1. Egy cseppnyi vizsgálati anyagot fedőlemez közepére cseppentünk
2. Vájt tárgylemez vájulatának peremét vékonyan bekenjük vazelinnel
3. Óvatosan a fedőlemezre tesszük
4. Hirtelen mozdulattal megfordítjuk
5. Vizsgálatnál a beállítás ua. mint előzőnél

⇒ a mozgás jobban megítélhető

⇒ nehezebben szárad ki

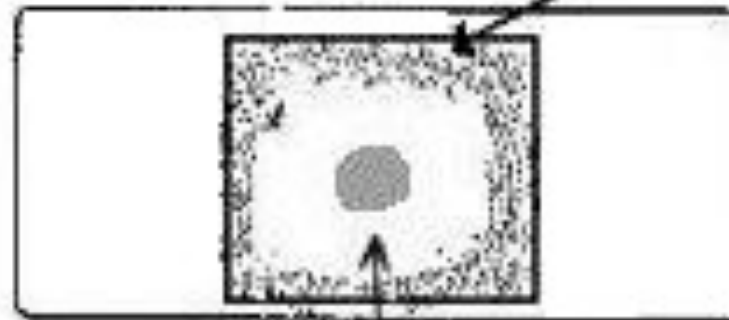
Natív készítmények

baktérium szuszpenzió



fedőlemez

vazelin



fedőlemez



A baktériumok, gombák, vagy protozoonok vizsgálatához készített függőcsepp (nehezebben szárad ki, mint a lapos csepp)



Natív készítmények

C) Vitális festés

1. Lapos cseppet készítünk
2. Egy csepp hígított vizes festékoldatot cseppentünk a fedőlemez széléhez
3. 10 percig várunk

Az élő mikroorganizmusok színeződnek a festékanyaggal, mely kis töménységben nem károsítja őket.

Fetékek: metilénkék, fuchsin, kristályibolya, carbol-fuchsin, Löffler-féle alkalikus metilénkék



Festett készítmények

A festődés a baktériumsejt (gomba, protozoon) alkotórészei és a festékkoldat között lezajló fizikai – kémiai reakciók eredménye. A bázikus festékek a baktérium sejtek savanyú vegyhatású alkotóit (pl. magkromatin), a savanyú festékek a baktérium sejtek bázikus elemeit (pl. citoplazma) festik



Festett készítmények

Kenetkészítés, fixálás, majd –

Egyszerű festékek:

- alkoholos vizes metilénkék,
- alkoholos vizes fuchsin,
- alkoholos vizes kristályibolya,
- Löffler-féle alkalikus metilénkék,
- carbol-fuchsin

Összetett festések:

- **Gram-festés**
- **Ziehl-Neelsen festés**
- **Neisser festés**
- Spórafestési eljárások
- Csillófestési eljárások
- tokfestési eljárások
- Giemsa-festés
- Fontana-féle ezüstimpregnáció



Kenetkészítés és fixálás

Folyékony mintából:

A tiszta, zsírtalanított tárgylemezen a kaccsal felvett szuszpenziót kb. köröm nagyságú területen elszélesztjük, majd szobahőn hagyjuk megszáradni.

Kitenyésztett mintából:

A laposcseppnél leírt módon szuszpenziót készítünk, majd elkészítjük a kenetet.

Szobahőn száradás után a **fixálás** hővel történik. A Bunsen égő lángja felett (kikent oldalával felfelé) a Cornet csipeszbe fogott tárgylemezt 3x áthúzzuk.

- 65-75 °C felett a mikróbák elpusztulnak
- a fehérjék koagulálódnak
- szilárdan a tárgylemezre tapadnak



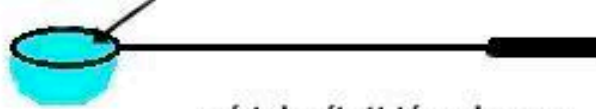
Festett készítmények

Egyszerű festés : Metilénkék

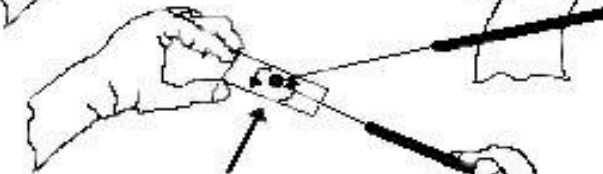
1. Kenetkészítés és fixálás,
2. Lehűlés után a festőállványra helyezzük a kenetet,
3. Festékoldatot öntünk rá, 1-3 percig hatni hagyjuk,
4. Csapvízzel leöblítjük,
5. Szűrőpapírral leitatjuk,
6. Immerziós olajjal, 100 X nagyítással, emelt kondenzorral vizsgáljuk.

Minden mikroorganizmus kék.

folyékony tenyészet



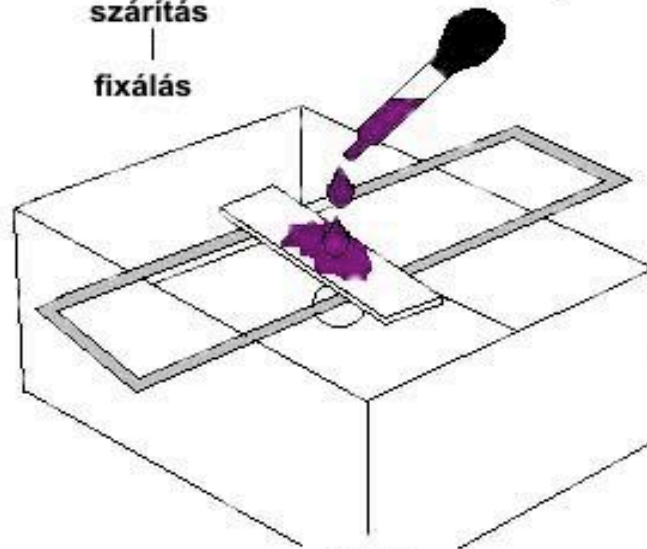
zsírtalanított tárgylemez



kenetkészítés kb. 1 cm
átmérőjű területen

szárítás

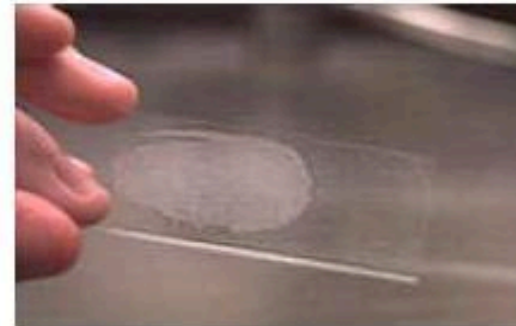
fixálás



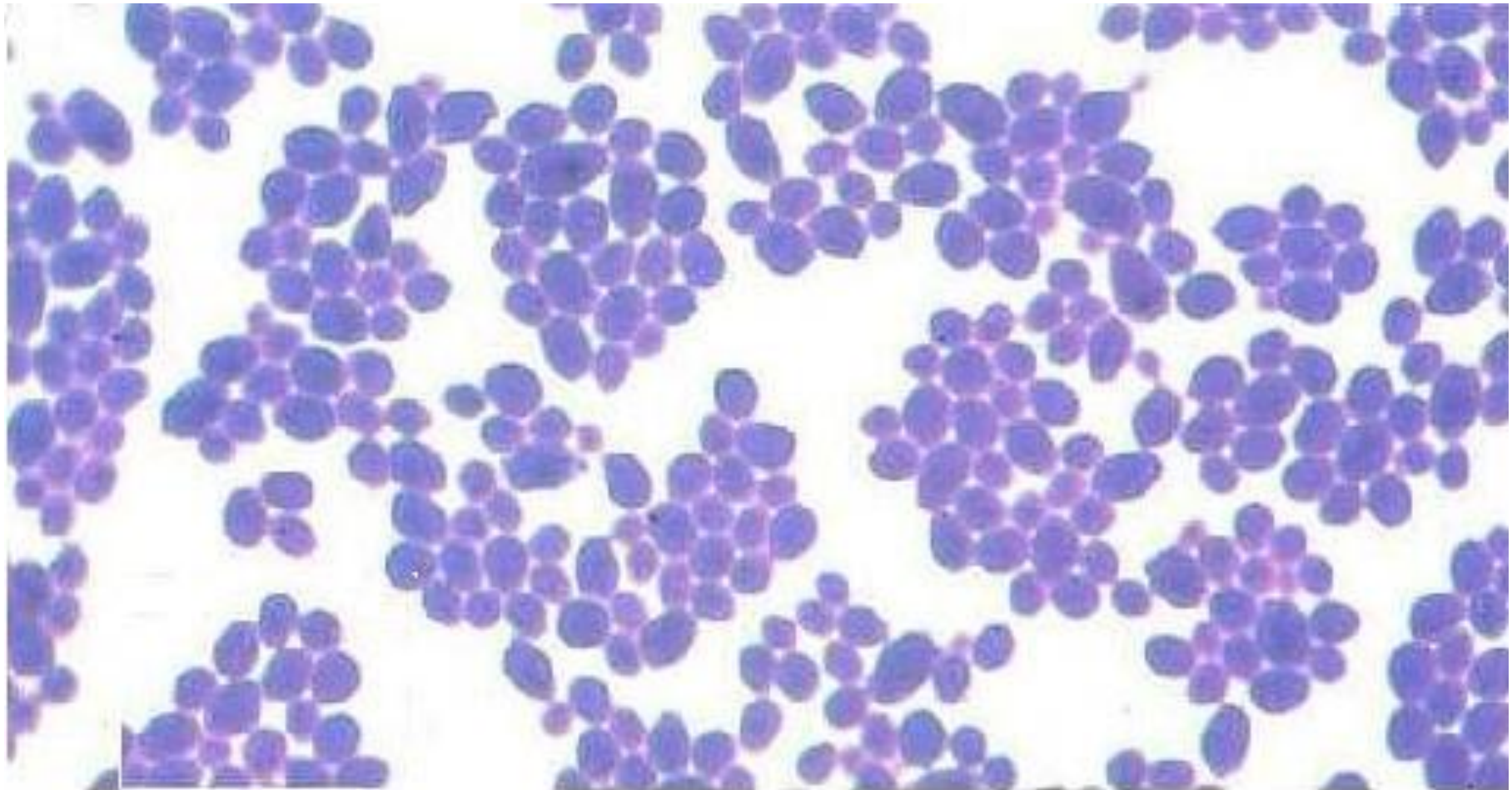
festés



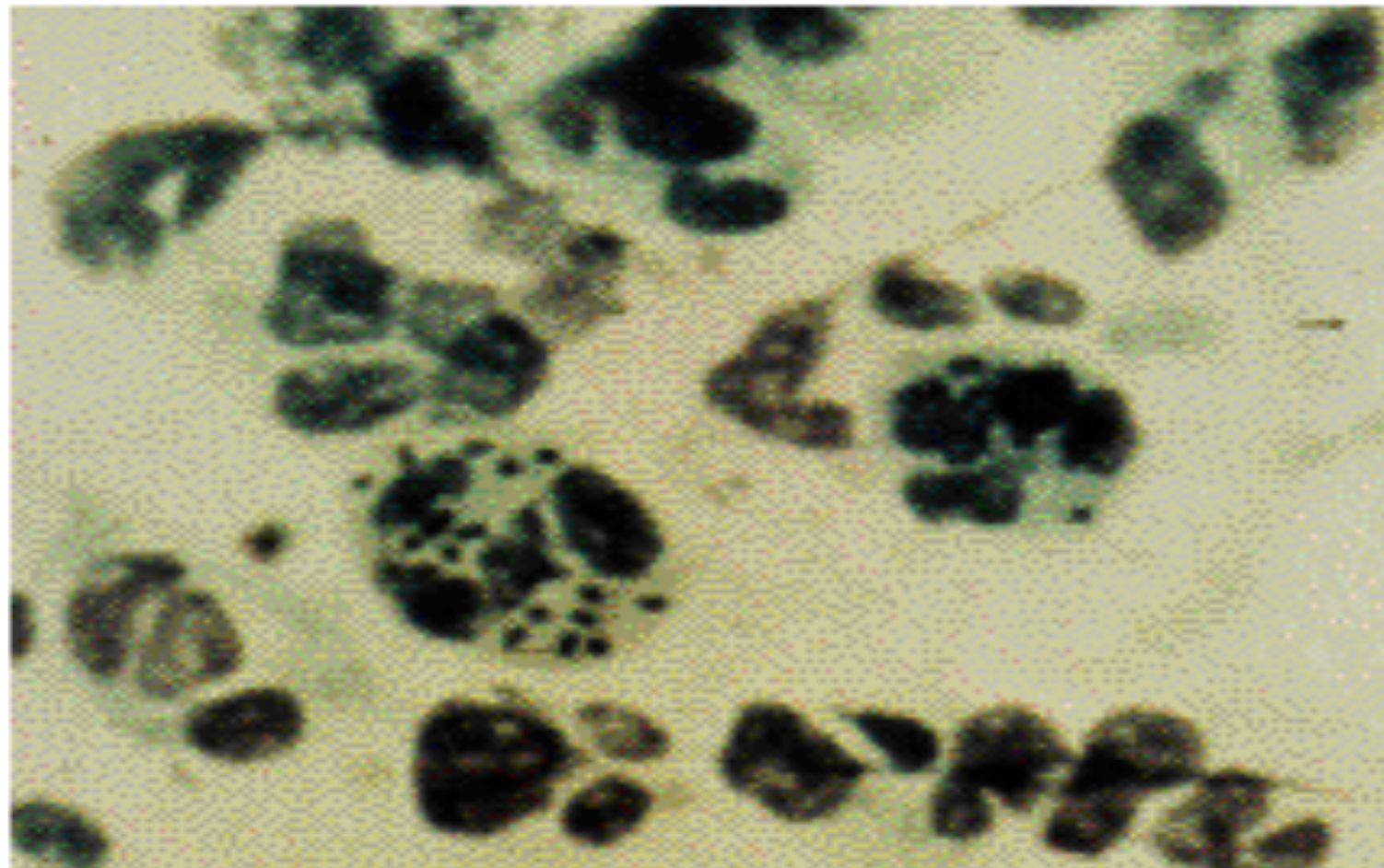
a szilárd táp-
talajról levett
mintát egy
csepp vízben
szuszpendál-
juk



A kenetet zsírtalanított tárgylemezen készítjük el (Cornet-csípőbe fogva többször áthúzzuk a Bunsen láng felett). A baktérium szuszpenziót levegőn szárítjuk, majd a Bunsen láng felett többször áthúzva fixáljuk (a nedves állapotban történő fixálás a mikrobák deformálódásához, rosszul festődő torz alakokhoz vezet!)



Sarjadzó gomba (*Candida albicans*) egyszerű festéssel (metilénkék) készített kenete



***Neisseria gonorrhoeae* (egyszerű festés, metilénkék)**

Gram festés

1884-ben, a dán Hans Christian Gram fedezte fel (pneumoniában elhalt beteg tüdőszövetét vizsgálva)

Alapvető differenciáló festés:

Gram pozitívak: lila/sötétlila/kék

Gram negatívak: piros



Gram szerint nem festődnek:

Mycobacteriumok, chlamydia, mycoplasma, rickettsia, legionella csak tenyészetből, spirochéták túl keskenyek

Festődést befolyásol(hat)ja:

a tenyészet kora, előzetes antibiotikum kezelés, intracelluláris elhelyezkedés

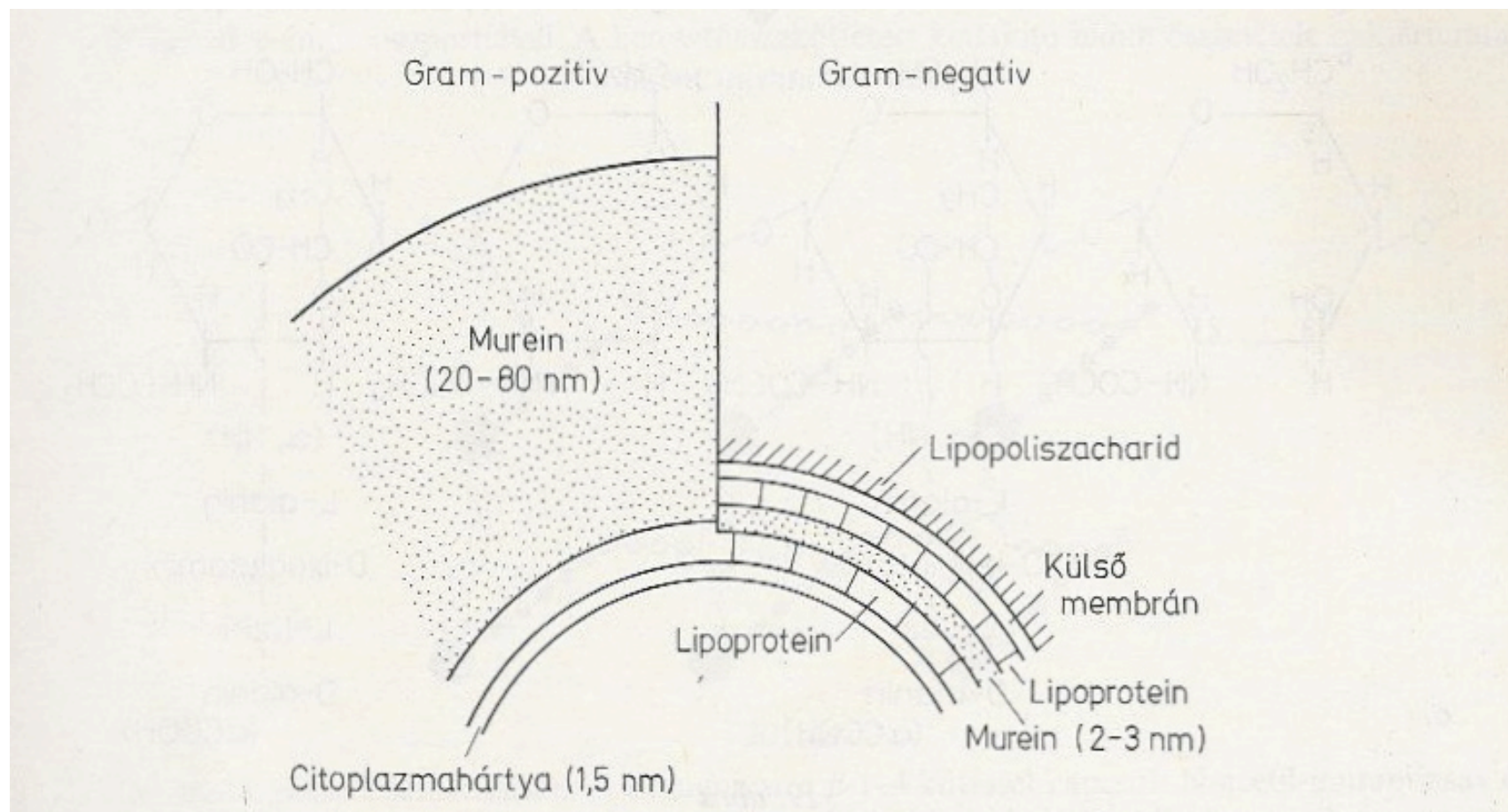
Alternatívái:

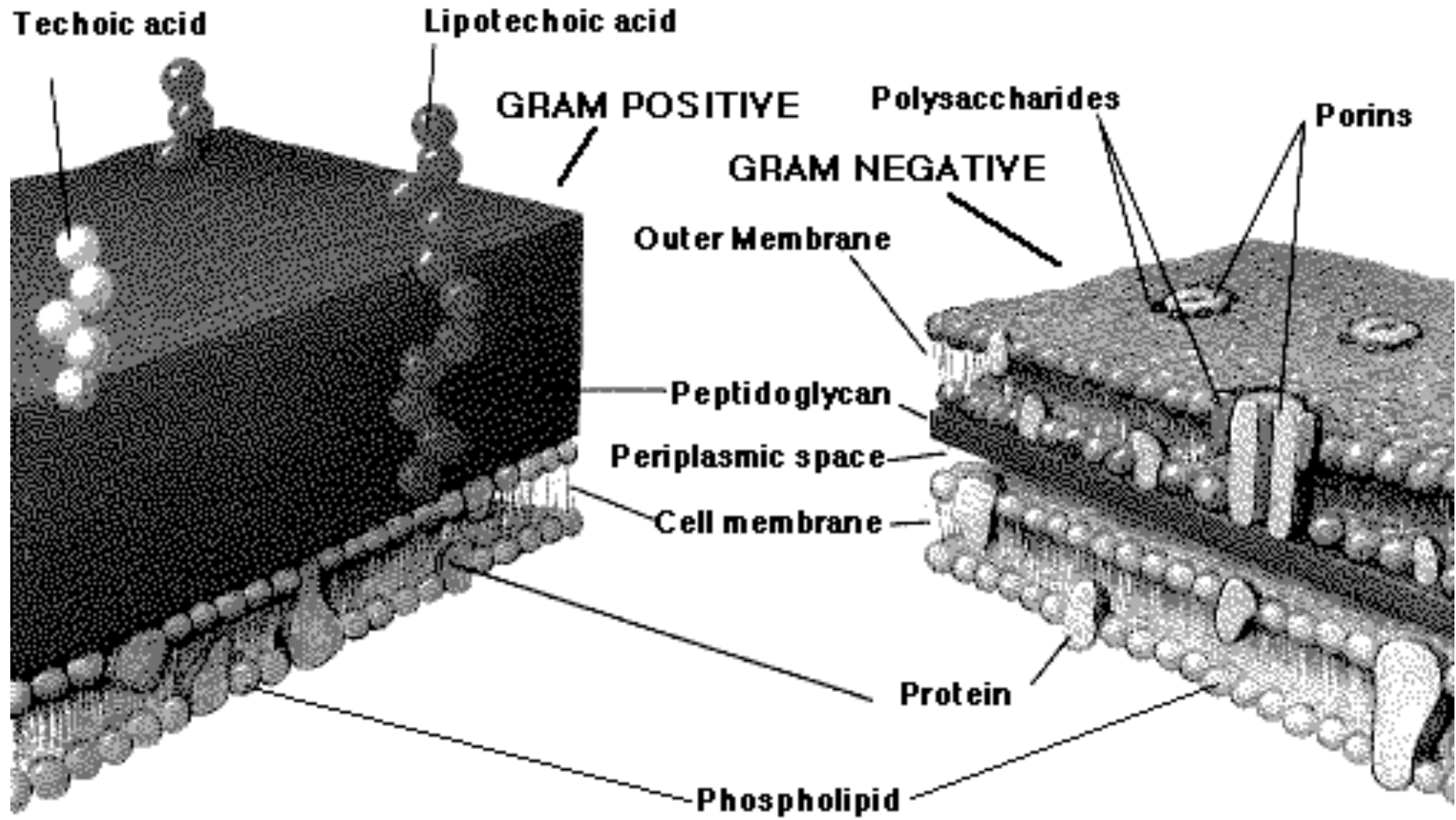
Japán próba – kálium-hidroxid hatására dezintegrálódik a sejtfal, G⁻ DNS-éből szálat lehet húzni.

Bizonyos antibiotikumok iránti érzékenység

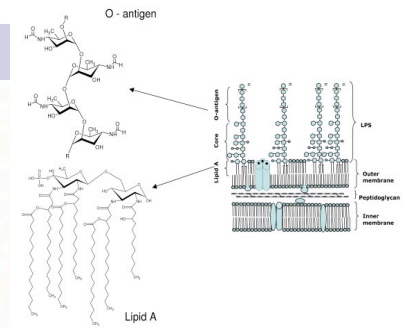
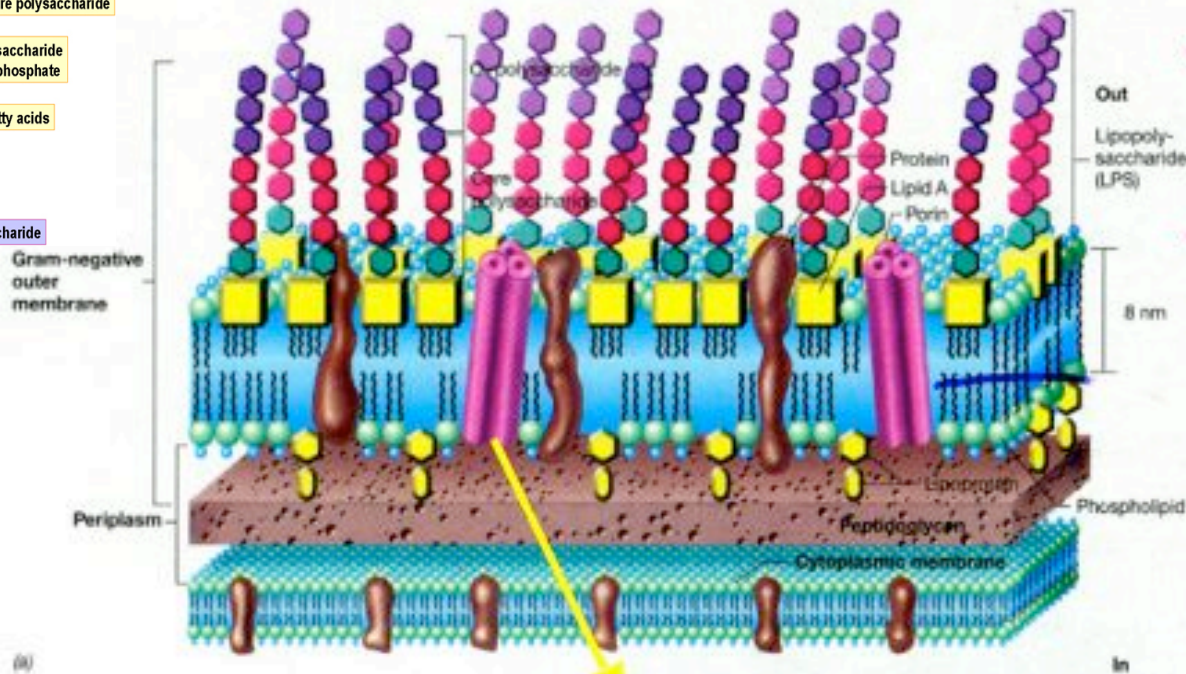
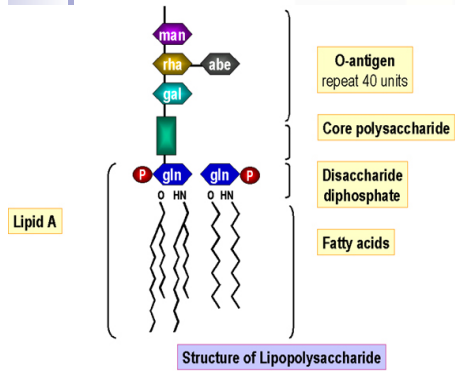


Gram⁺ és Gram⁻ baktériumok sejtfalának vázlatos összehasonlítása



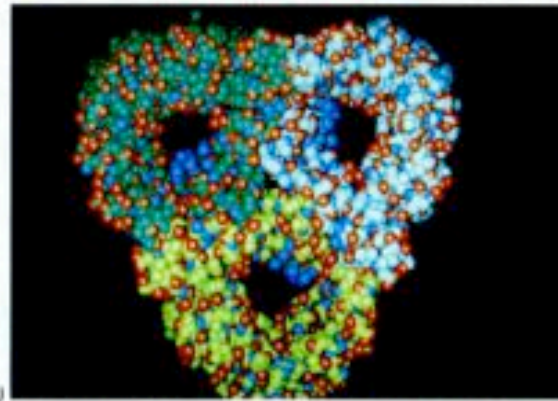


3.37 The Gram-negative outer membrane



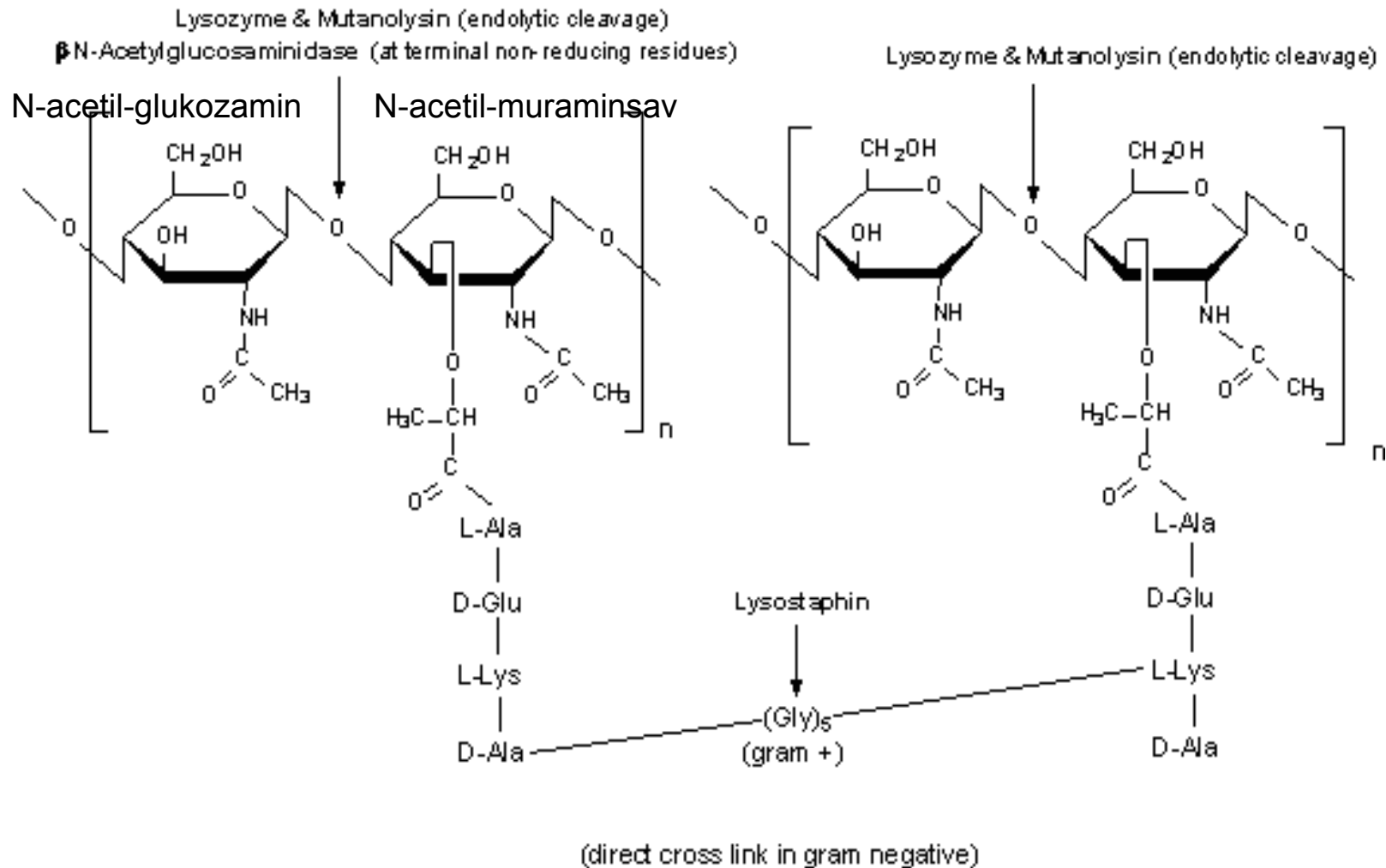
The endotoxin of Gram neg. cells.

Note how complex this cell wall is compared to the Gram positive wall. Especially note how little peptidoglycan is present and how there is an outer membrane and a periplasmic space outside of the cell membrane.



Molecular model of porin proteins containing 3 pores.

A peptidoglycan szerkezete



GRAM festés (összetett festés)

1. Fixált kenetet **karbolos kristályibolyával** 2 percig festjük.
2. Leöntjük, majd 1 percig **Lugol** oldattal festünk.
3. **96%-os alkohollal** differenciálunk. A Cornet-csipeszbe fogott és ferdén tartott tárgylemezre addig csepegtetjük az alkoholt, míg minden felesleges festék ki nem mosódik és az alkohol szintelenül csepeg le.
4. Csapvízzel öblítünk.
5. Carbol-fuchsinnal vagy **safraninnal** 1 percig utófestést végzünk.
6. A festék leöntése után vízzel leöblítjük.
7. Szűrőpapírral szárítjuk
8. Olajimmerzióval vizsgáljuk.



kristályibolya
2 perc



Lugol oldat
1 perc



alkoholos
differenciálás

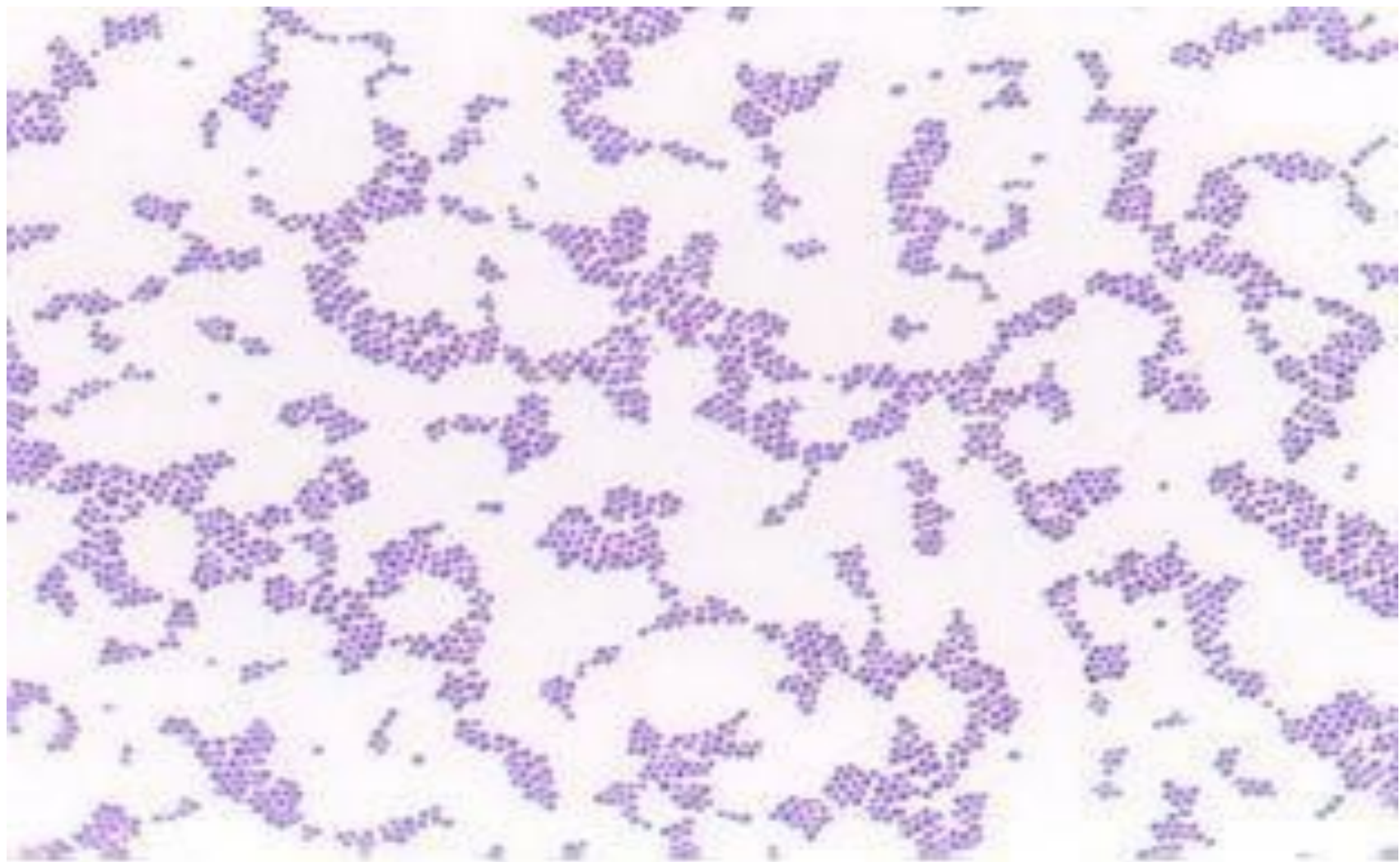


safranin
2 perc

A festődés jellegét elsősorban a sejtfa-
lat határozza meg,
de a bázikus anilinfestékekkel
(kristályibolya) a citoplazmát és
sejtalkotókat,
nem pedig sejtfa-
latat festünk!

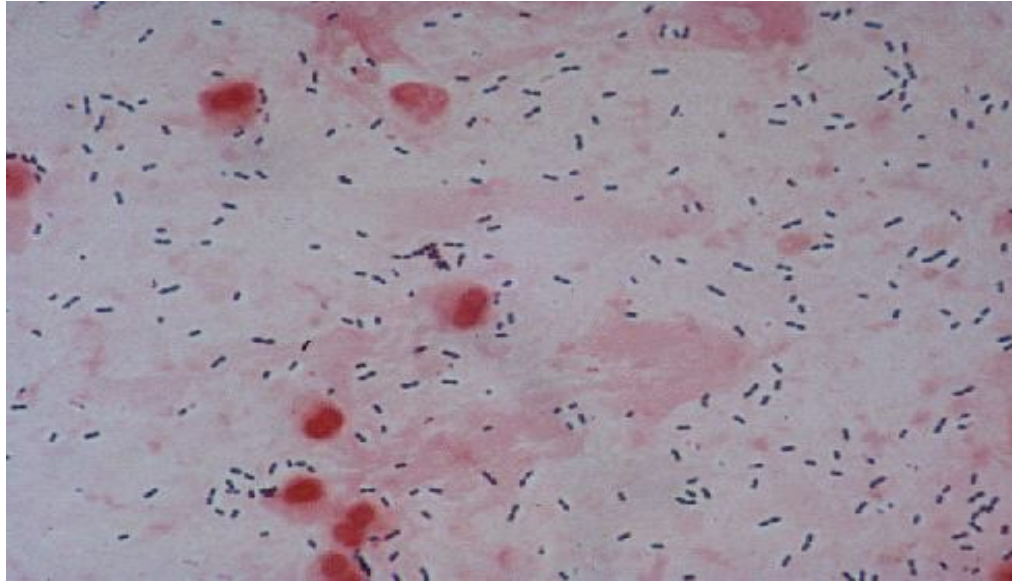
	Gram-pozitív	Gram-negatív
festés előtt		
kristályibolya festés után		
Lugol oldat után		
Alkoholos differenciálás után		
safraninos utófestés után		

Gram-festés: a kristályibolya és a Lugol oldat (KJ-ot tartalmazó jód oldat) egymásra hatásából keletkező jód-para-rozanilint az alkoholos differenciálás kioldja a Gram-negatív baktériumokból (elszintelenednek), ezek az utófestésre használt safranintól piros színűre színeződnek, míg a Gram-pozitívok színe (sötétlila) nem változik

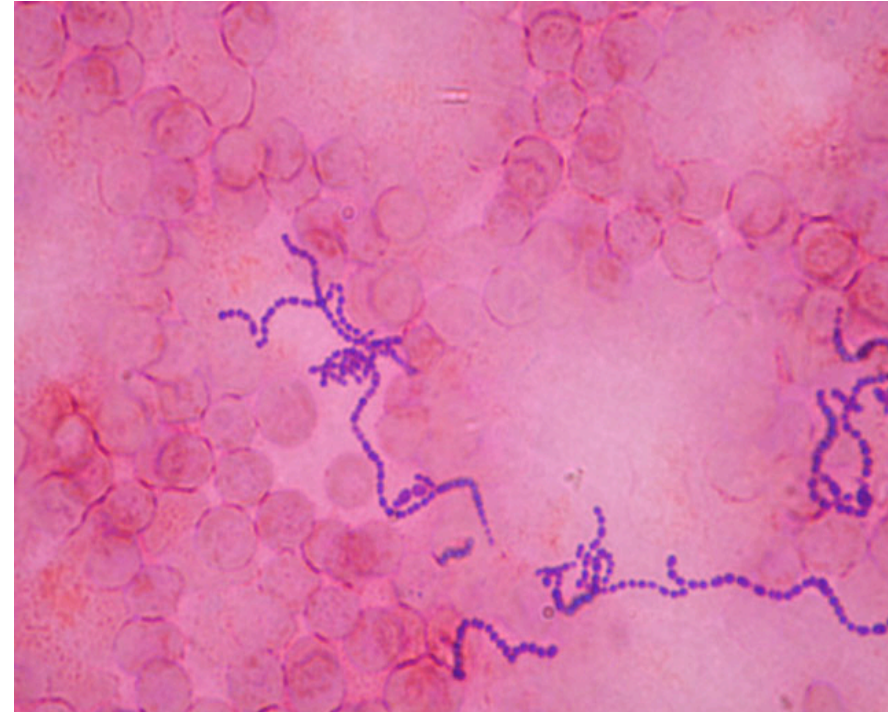
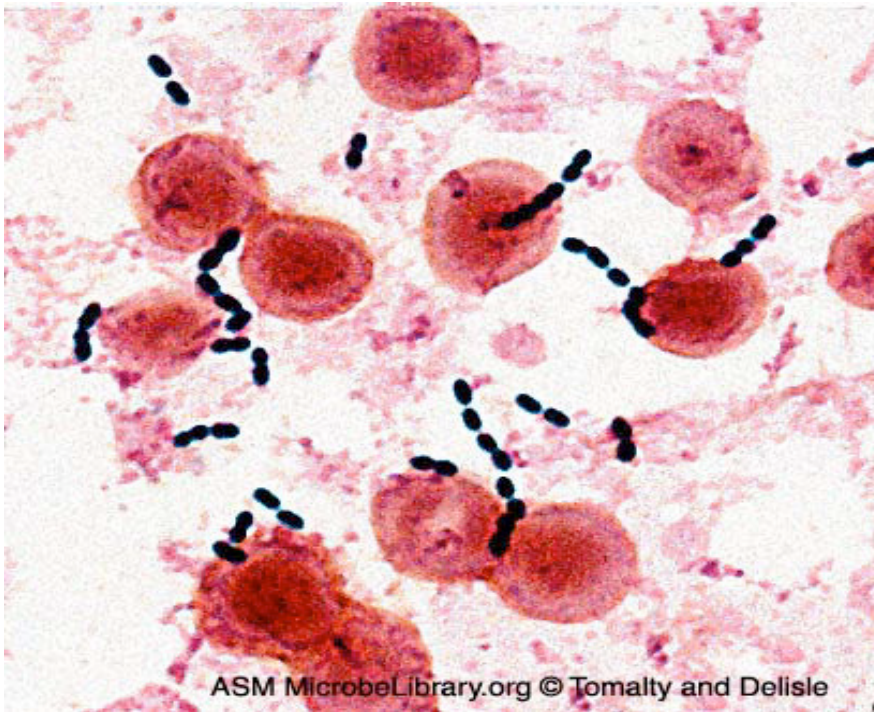


Gram-pozitív coccusok "szőlőfürt-szerű" elrendezésben (Staphylococcus)

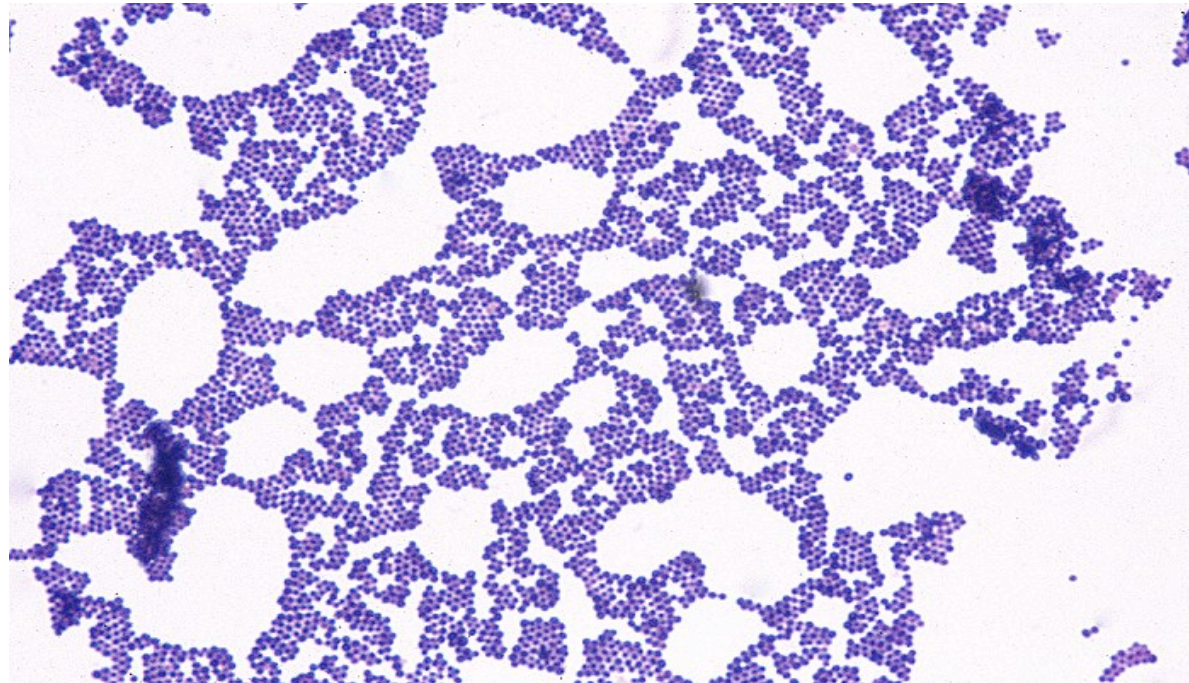
Streptococcus pneumoniae: diplococcus

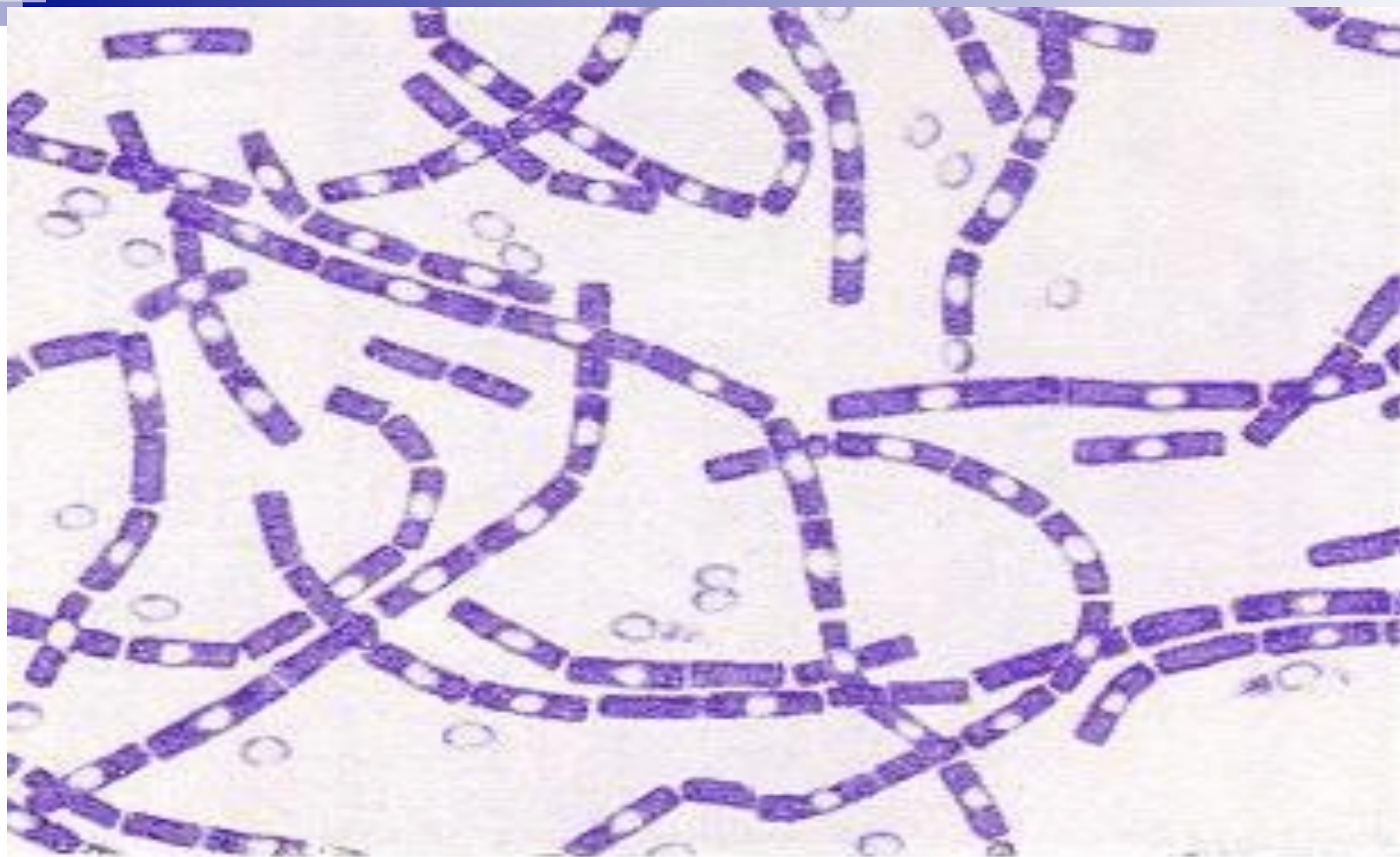


Streptococcus pyogenes: láncba rendeződnek



Staphylococcus:
szőlőfürt szerű elrendeződés

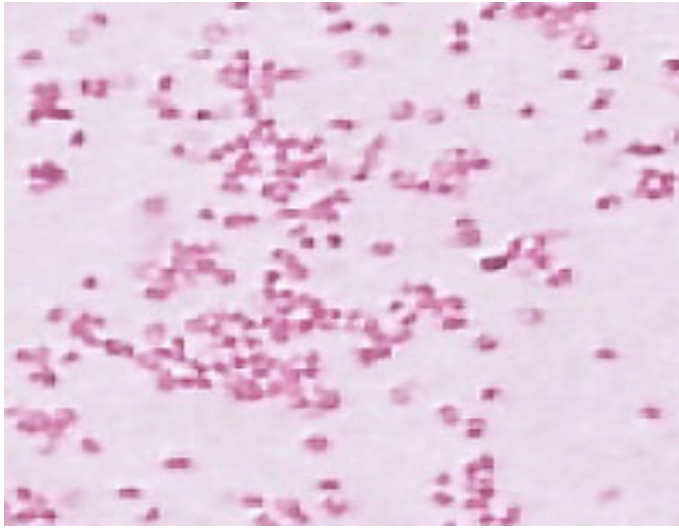




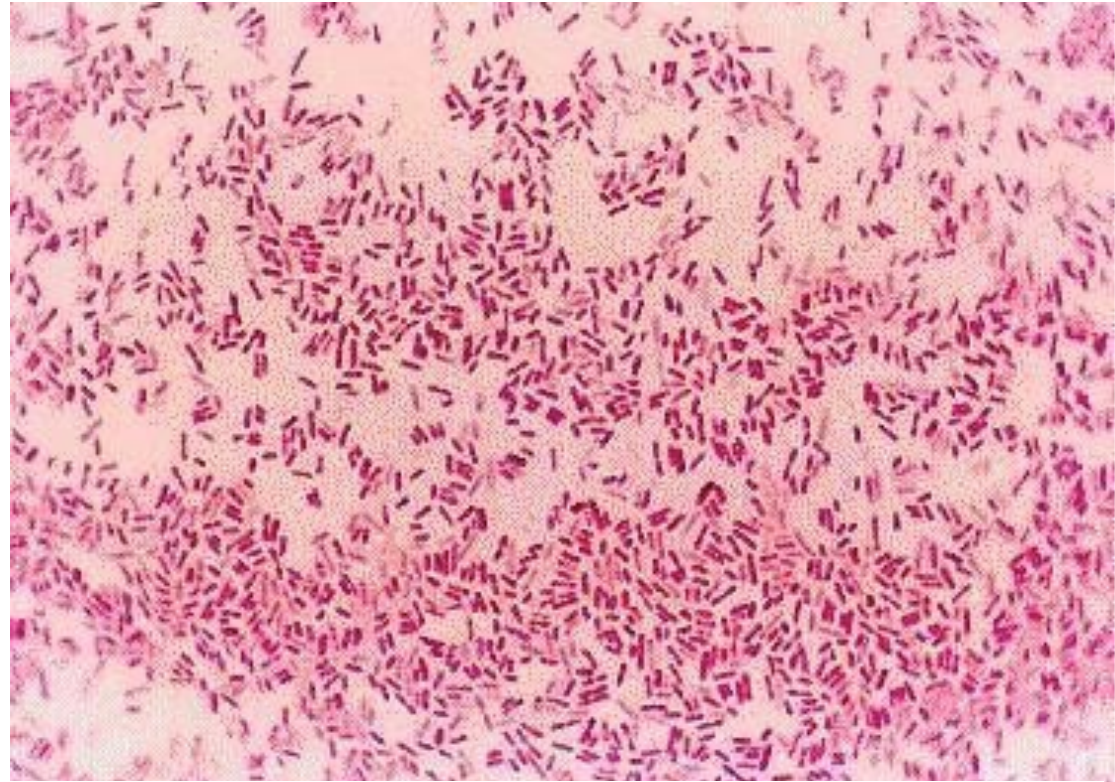
Gram-pozitív pálca, közepén nem festődő, a baktériumtestet nem deformáló spóra látható (*Bacillus cereus*)

Helicobacter pylori: pálca





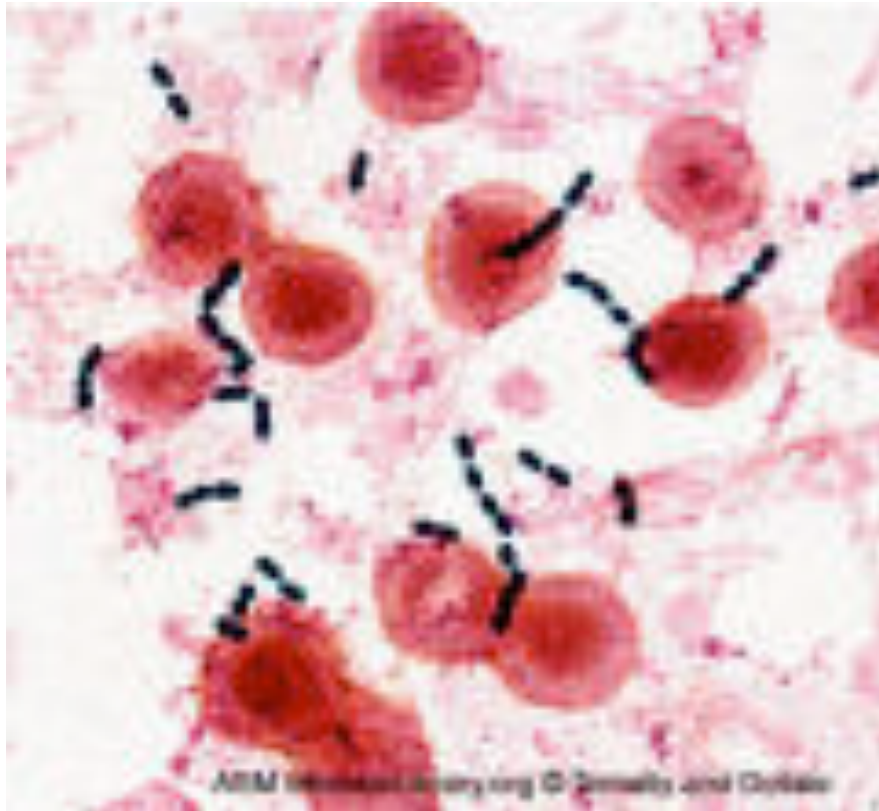
Gram negatív coccusok
(*Neisseriaceae*)



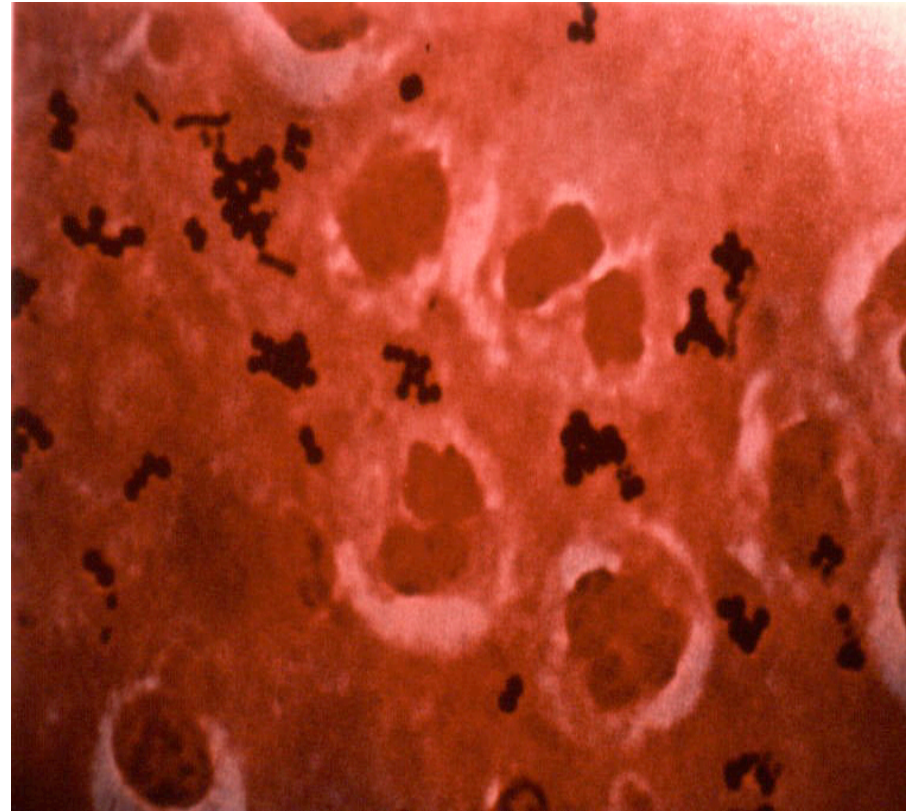
Gram negatív bacillusok (*Escherichia coli*)



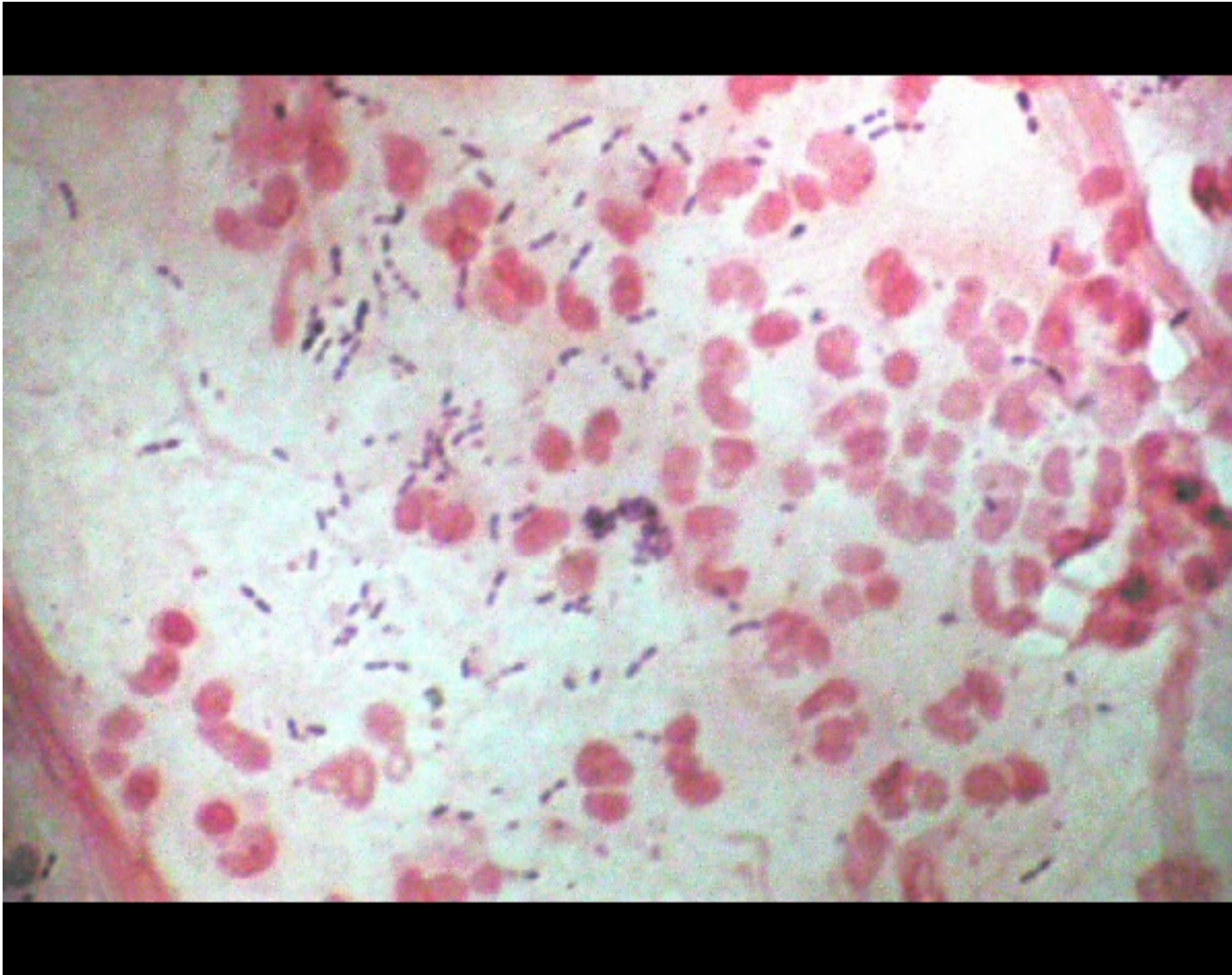
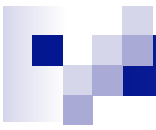
Gram negatív bacillusok (*Pseudomonas aeruginosa*)



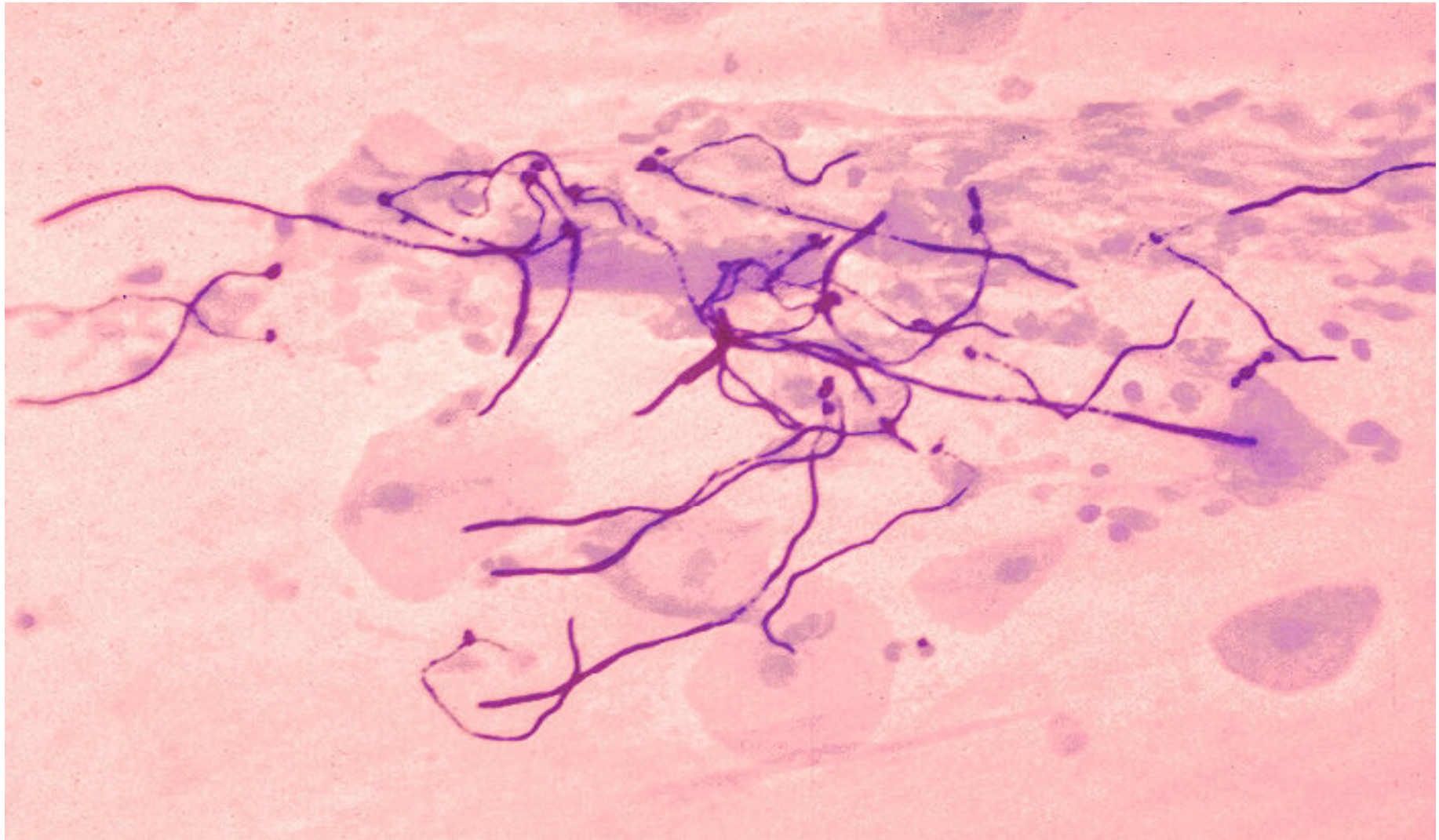
**Gram pozitív coccus láncok
hemokultúrában
(*Enterococcus faecalis*)**



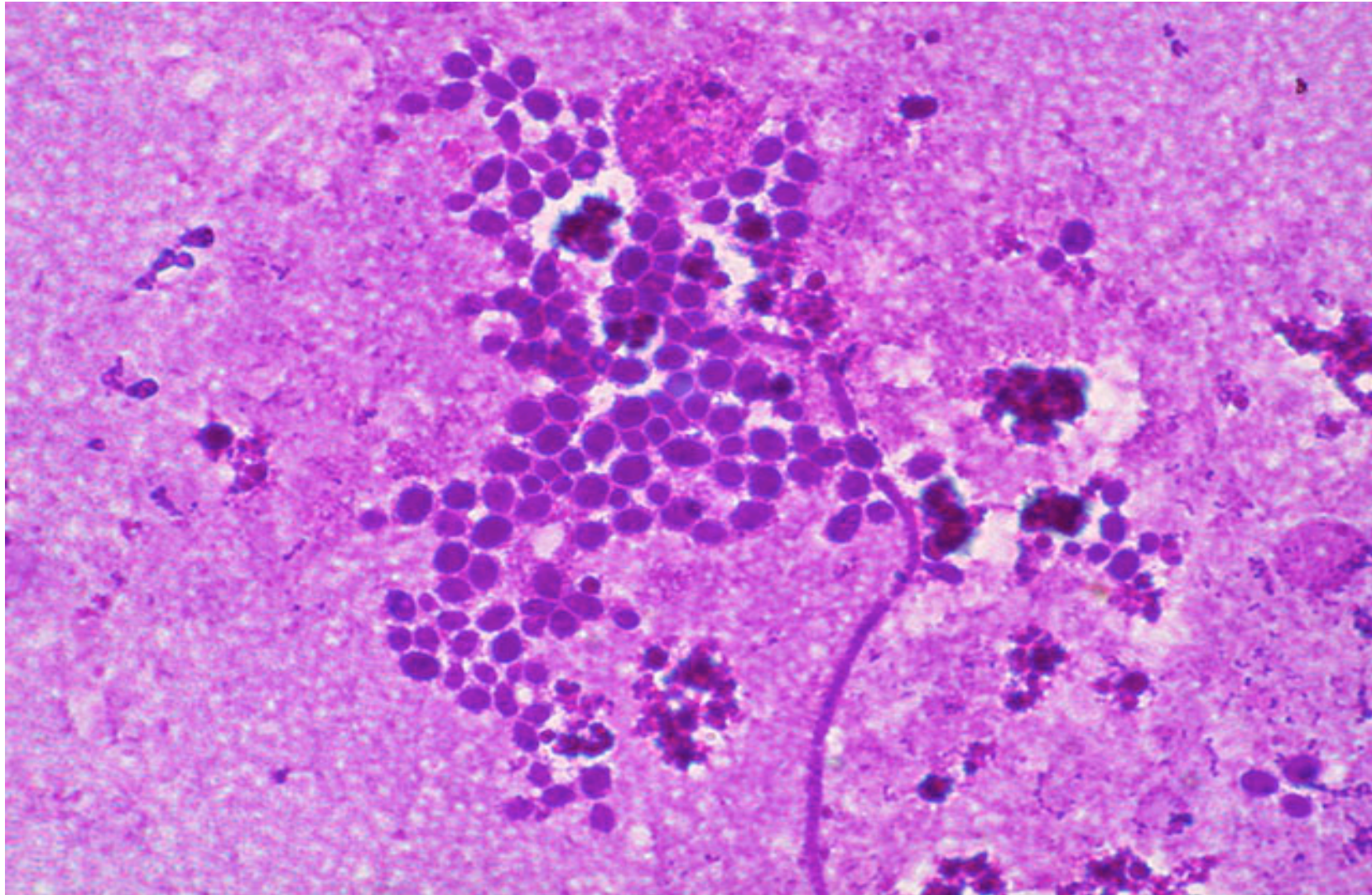
**Gram pozitív coccusok
szőlőfürtszerű elrendeződésben
(*Staphylococcus aureus*)**



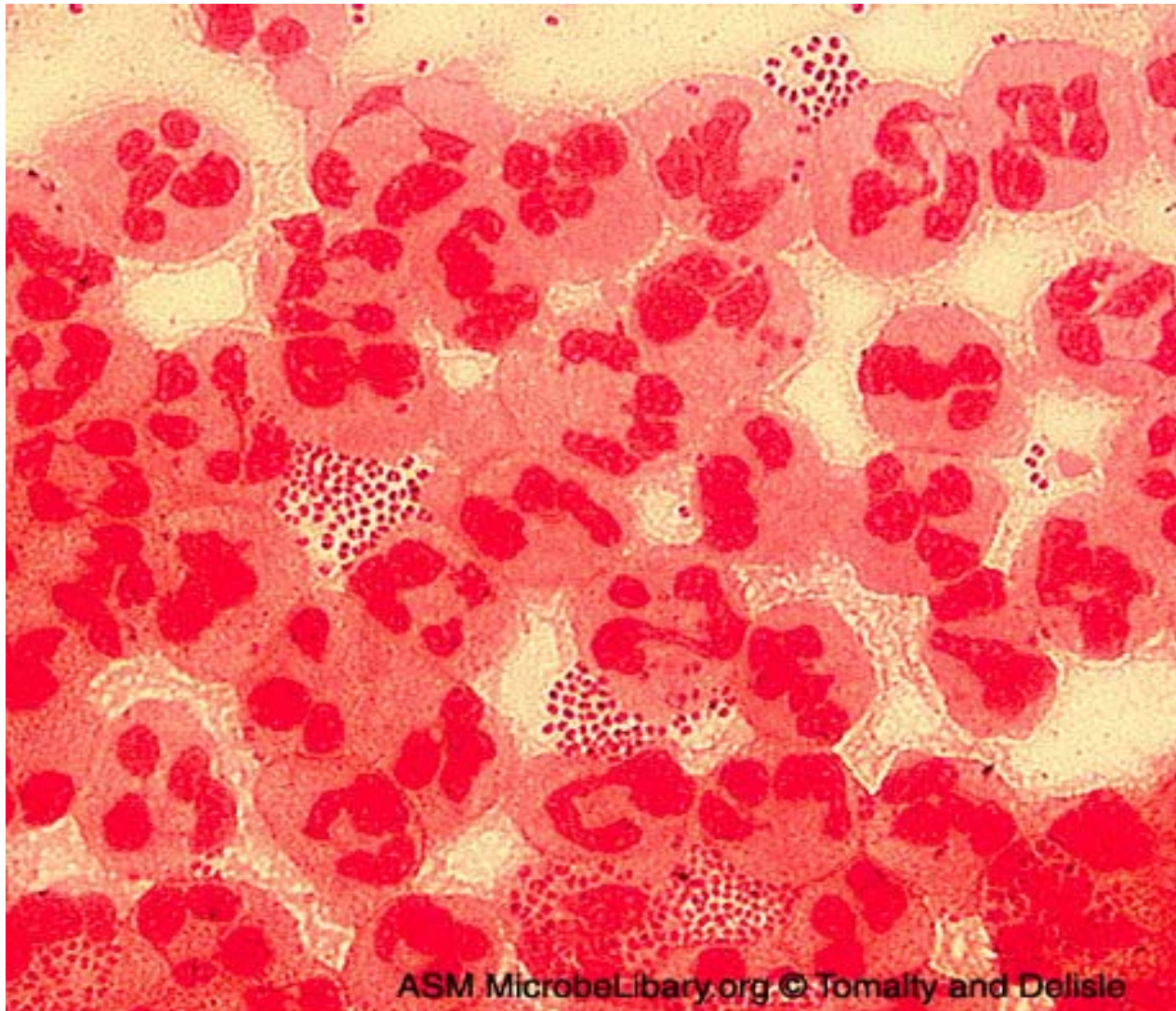
Gram pozitív diplococcusok köpetben (*Streptococcus pneumoniae*)



Gram pozitív pseudohyphák hüvelyváladékban (*Candida albicans*)

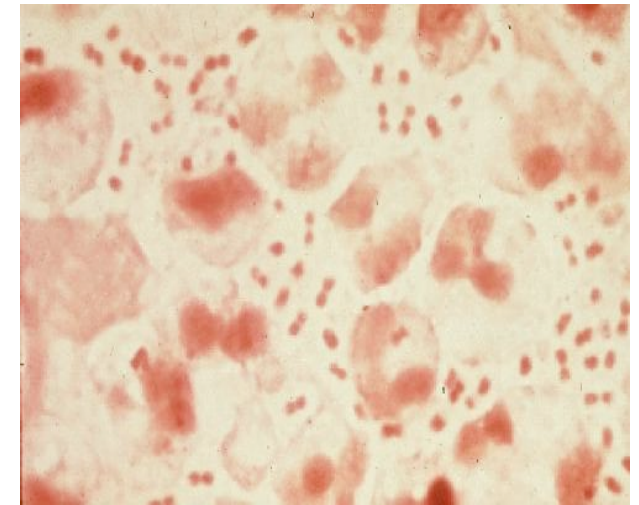


Gram pozitív sarjadzó gomba hüvelyváladékban (*Candida albicans*)

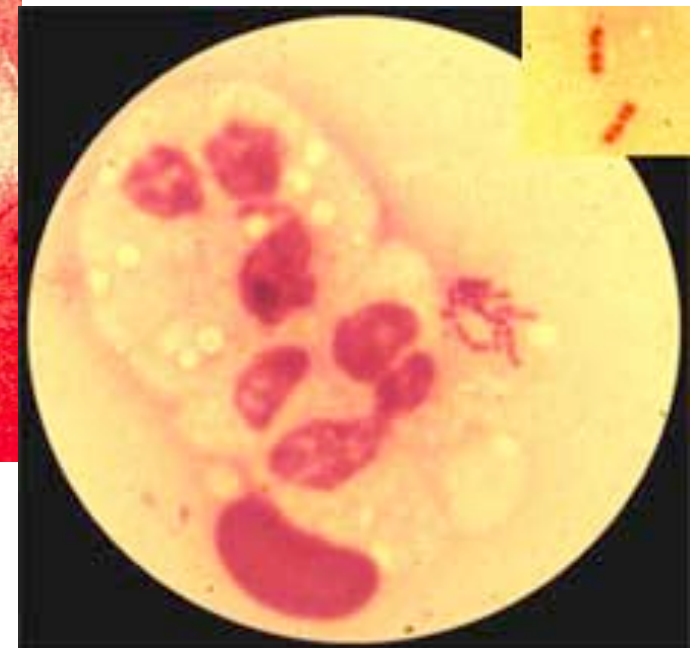


ASM MicrobeLibrary.org © Tomalty and Delisle

Neisseria gonorrhoeae húgycsőváladékban



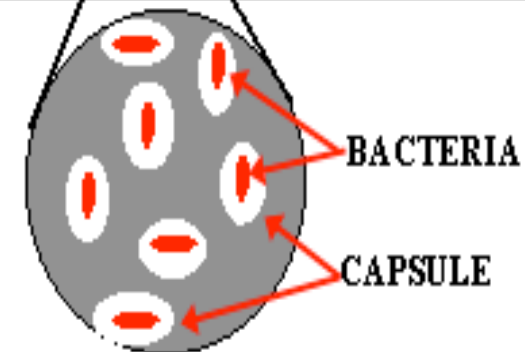
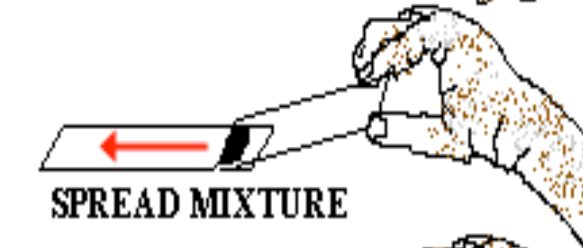
N.gonorrhoeae



Haemophilus ducreyi gennyben

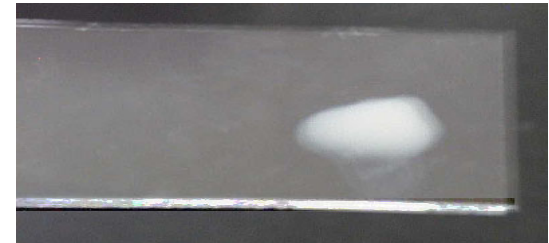
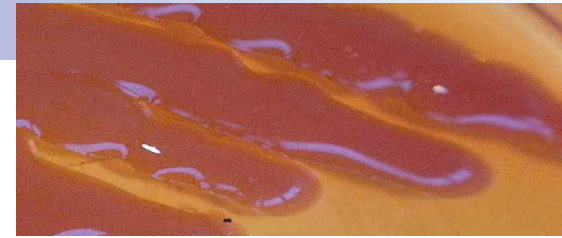
Tusfestés / Negatív festés

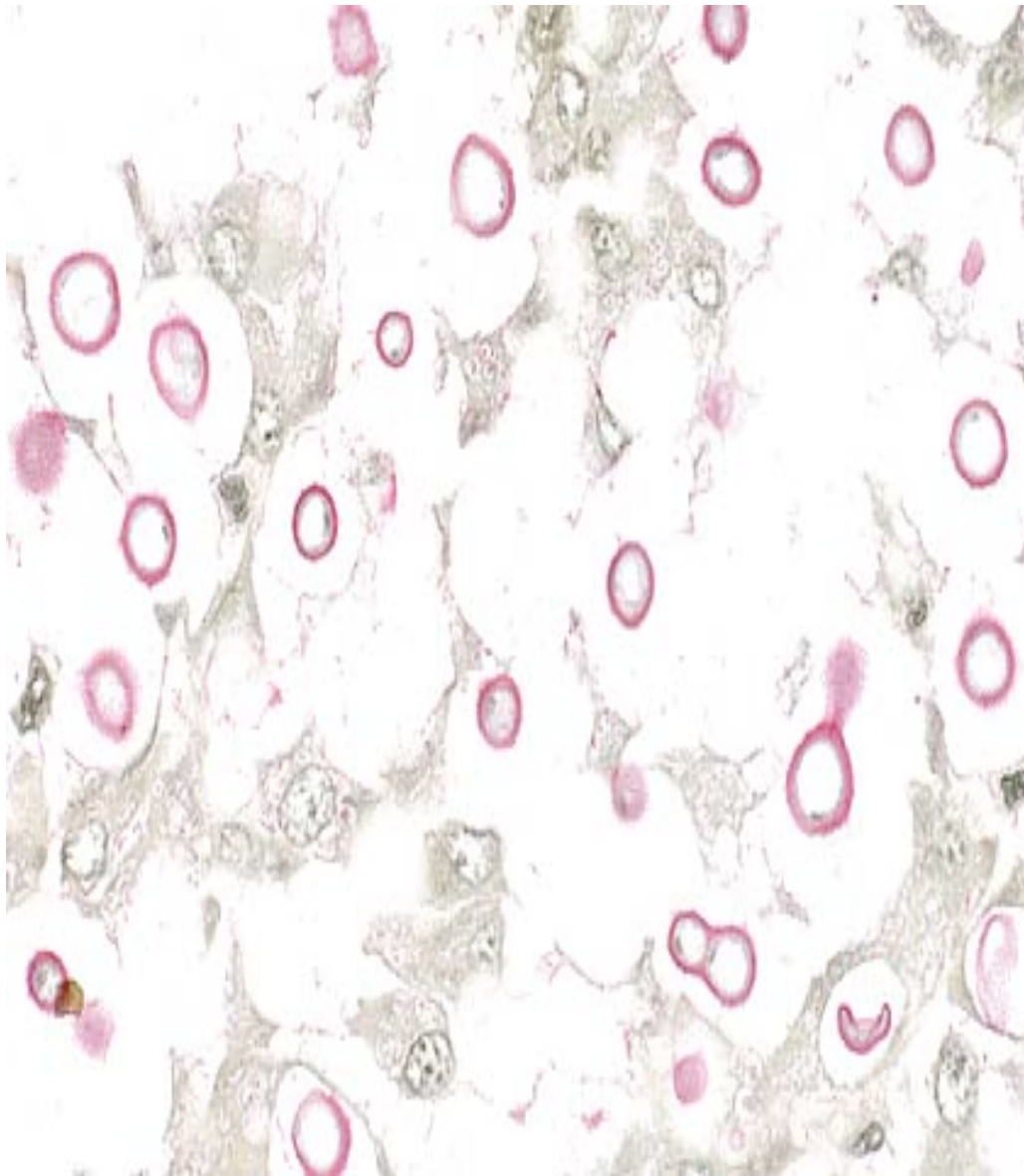
**Tokos
mikroorganizmusok
vizsgálatára alkalmas. A
készítményben a tus-
szemcsék kitöltik a
mikroorganizmusok
közötti teret, s azok
tokja a fekete látótérben
jól kirajzolódik.**



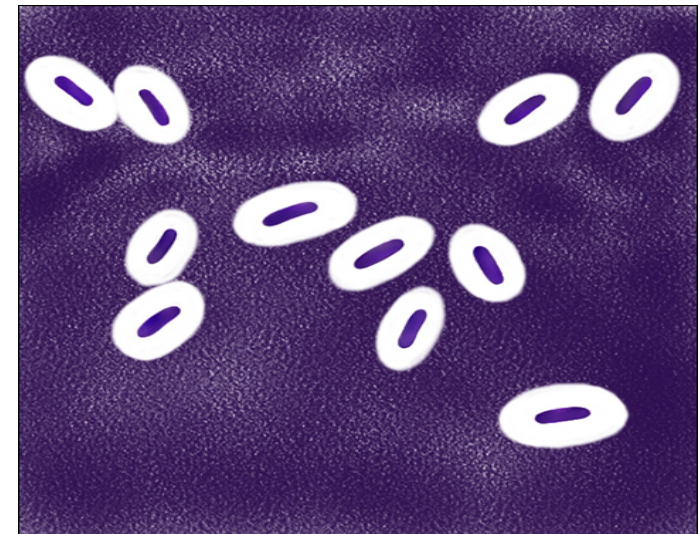
Tuskészítmény

1. Baktérium (gomba) szuszpenzióból egy cseppet tárgylemez egyik szélére cseppentünk.
2. 1 csepp tus (**India ink**).
3. Összekeverjük.
4. Vérkenet készítéshez hasonló módon készítünk egy vékony kenetet.
5. Szobahőn szárítjuk.
6. Hővel fixáljuk.
7. Fuchsinnal festjük.
8. Csapvízzel mossuk.
9. Szobahőn szárítjuk.
10. Immerzióval vizsgáljuk.

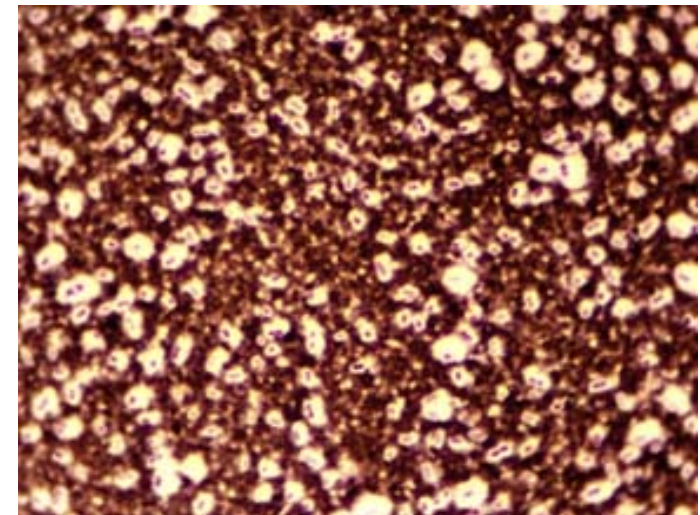




Cryptococcus neoformans



Klebsiella pneumoniae



Streptococcus pneumoniae

A microscopic image showing several green, rod-shaped bacteria with numerous flagella. The bacteria are scattered across the frame, with some appearing larger and more detailed than others. The background is a dark, gradient blue. The text "Köszönöm a figyelmet!" is overlaid in the upper right quadrant.

Köszönöm a figyelmet!