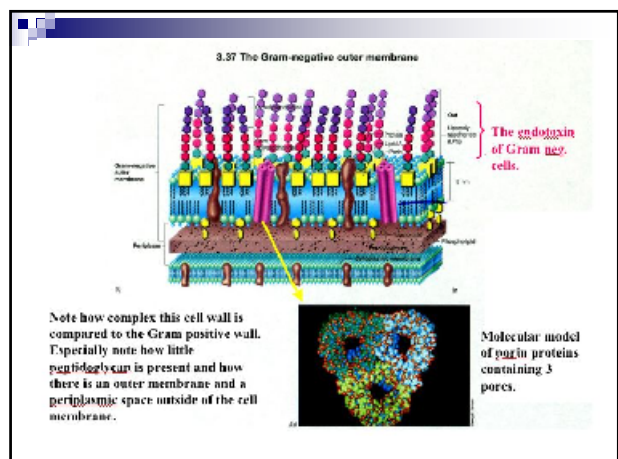
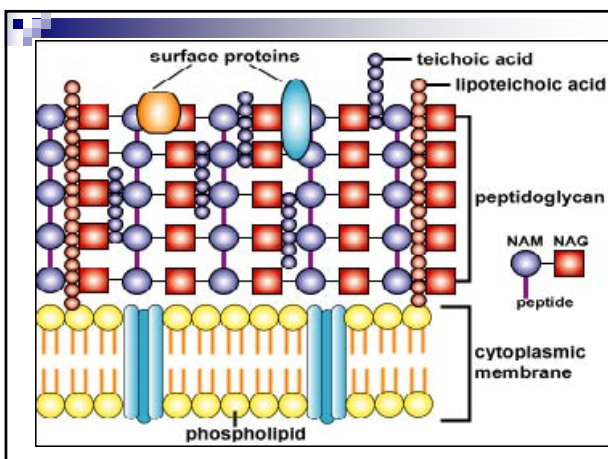


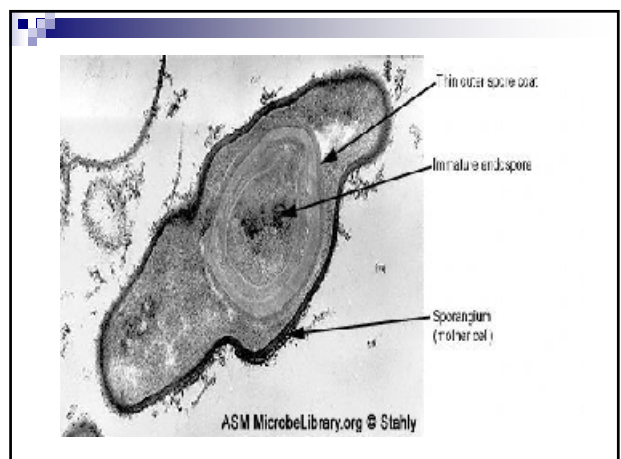
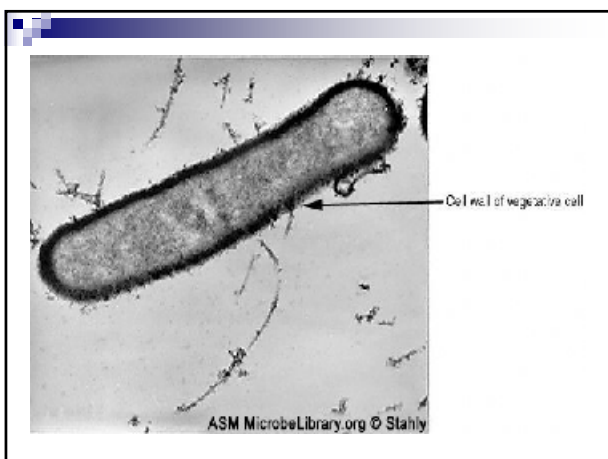
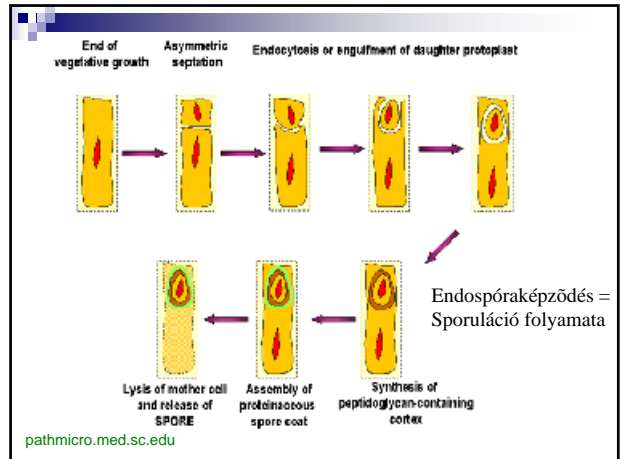
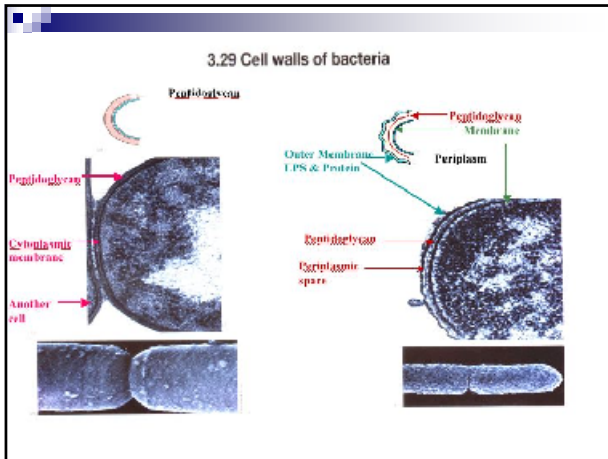
Mikroszkópos vizsgálatok

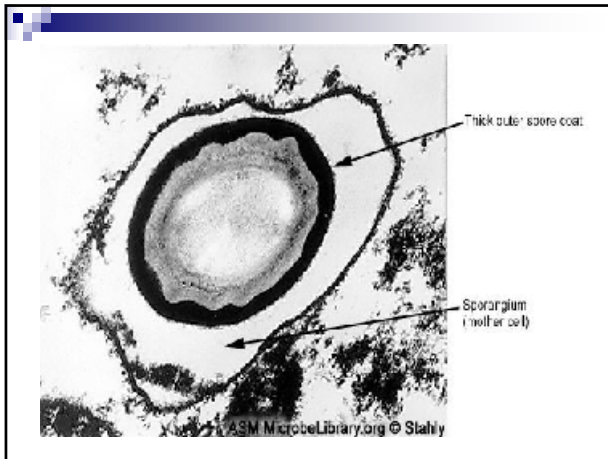
2009

A baktériumok obligát sejtalkotói

- sejtfa,
- citoplazma membrán,
- riboszóma,
- nukleoid,
- mezoszóma,
- periplazmatikus tér







A mikrobiológiai diagnosztika alapvető módszerei

Cél: a feltételezett infekciós kórkép etiológiai diagnózisa

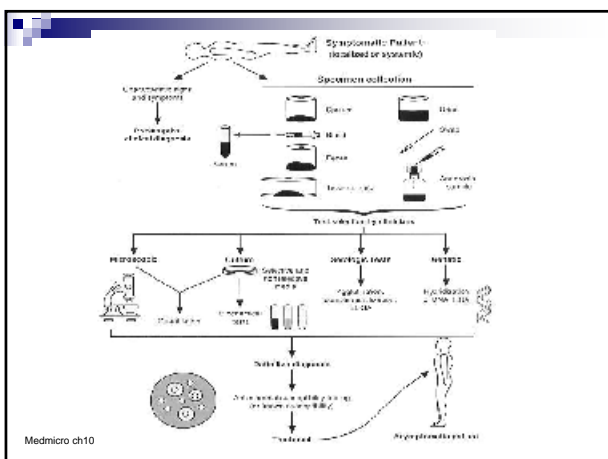
1. A kórokozónak, vagy anyagának direkt kimutatása és azonosítása

- a vizsgálati anyag makroszkópos megtekintésével
- natív és / vagy festett készítmény mikroszkópos vizsgálatával
- molekuláris biológiai módszerekkel (DNS, RNS kimutatás)
- állatoltással
- szerológiai vizsgálatokkal

2. A kórokozó kitenyésztése, majd azonosítása a vizsgálati anyagból

- telepmorfológia
- biokémiai reakciók segítségével
- mikroszkópos morfológia, CP hatás alapján
- szerológiai reakciók segítségével
- fágtipizálással
- állatoltással

3. A fertőzés hatására keletkezett humorális és celluláris immunválasz kimutatása



Mikroszkópos vizsgálatok

1. Fénymikroszkóp

- lencse: üveg, kvarc;
- energia: látható fény, UV fény;
- kép: retinán

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

2. Elektron mikroszkóp

- transmissziós elektron mikroszkóp
- scanning elektron mikroszkóp
- lencse: elektromágneses erő
- energia: gyorsított elektronok 50-1000KV
- kép fluoreszcens mezőn

felbontó képesség: 0,1 nm

maximális nagyítás: 500 000X

⇒ vírusok

3. Sötétlátóteres mikroszkóp

* speciális kondenzor → „sötét háttér” az élő, mozgó baktériumok alakja fel-felcsillan
⇒ Spirochéták vizsgálatára (treponema, borrelia, leptospira), keskenyebbek, mint a normál fénymikroszkóp felbontóképessége



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

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**

A . Lapos csepp

- folyékony szuszpenzióból tárgylemez közepére egy cseppnyit helyezünk kacsával vagy pipettával vagy
- tárgylemezre cseppentett steril fiziológiás sóoldatban szuszpendáljuk a szilárd tenyésztéből kacsával felvett kis mennyiségű mikroorganizmust és jól elszuszpendáljuk
- fedőlemezrel lefedjük
- süllyesztett kondenzorral, szűk diafragmával, kis nagyításon (400X max.) vizsgáljuk

B) Függőcsepp

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

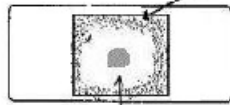
- ⇒ a mozgás jobban megítélhető
- ⇒ nehezebben szárad ki

Baktérium szuszpenzió



fedőlemez

vazelin



fedőlemez

Vájt tárgylemez



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

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

Festett készítmények

A festődés a baktériumsejt (gomba, protozoon) alkotórészei és a festékoldat 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

Kenetkészítés és fixálás

Folyékony mintából:

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

Kitenyészett mintából:

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

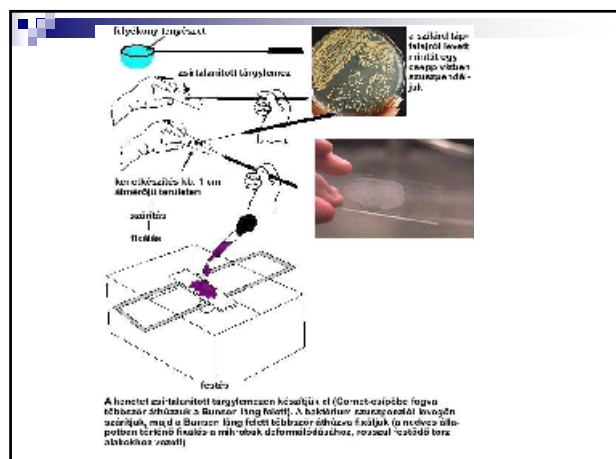
Szobahőn száradás után a fixálás hővel történik. A Bunsen égő lángja felett (kikent oldalával felfelé) a Cornet csipeszbe fogott tárgylemezt 3x áthúzzuk.

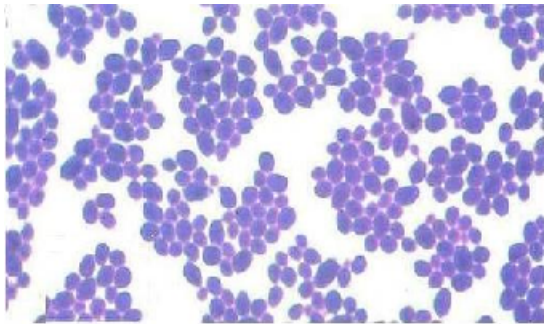
- 65-75 °C felett a mikróbák elpusztulnak
- a fehérjék koagulálódnak
- szilárdan a tárgylemezre tapadnak

Egyszerű festés : Metilénkék

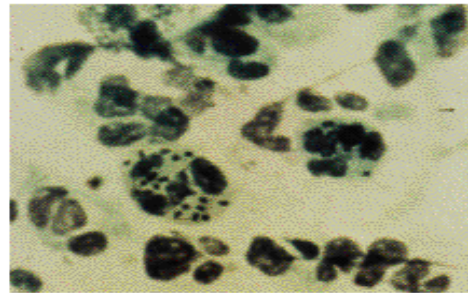
1. Kenetkészítés
2. Lehűlés után a festőállványra helyezzük a kenetet
3. Festékoldatot öntünk rá, 1-3 percig hatni hagyjuk
4. Csapvízzel leöntjük
5. Szűrőpapírral leitatjuk
6. Immerziós olajjal, 1000 X nagyítással, emelt kondenzorral vizsgáljuk

Minden mikroorganizmus kék.





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



Neisseria gonorrhoeae (egyszerű festés, metilénkék)

Gram festés

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

Alapvető differenciáló festés:

Gram pozitívak: lila/sötétlila/kék

Gram negatívak: piros



Nem festődnek:

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

Festődést befolyásol(hat)ja:

a tenyészet kora, előzetes antibiotikum kezelés, intracelluláris elhelyezkedés

Alternatívái:

Japán próba

Bizonyos antibiotikumok iránti érzékenység



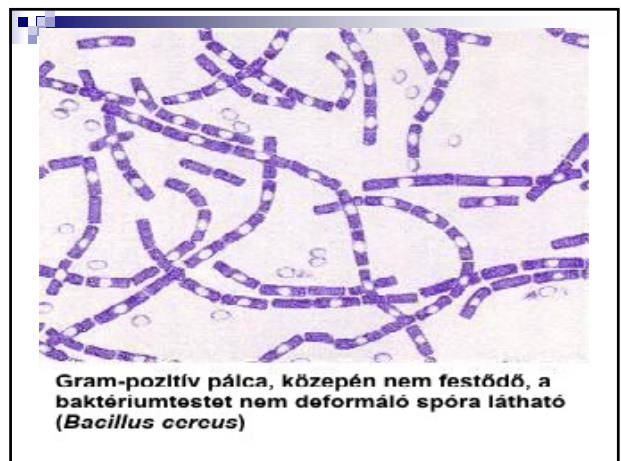
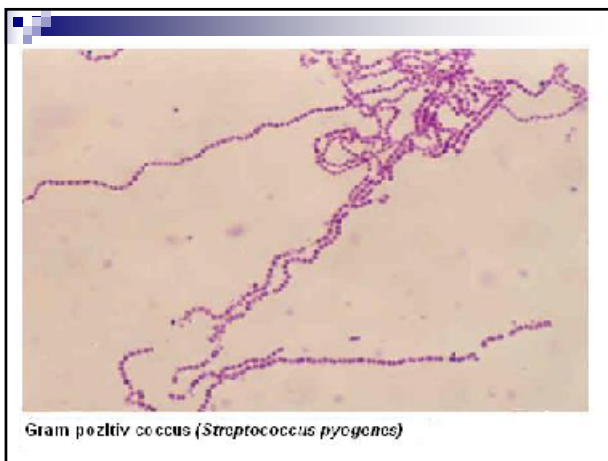
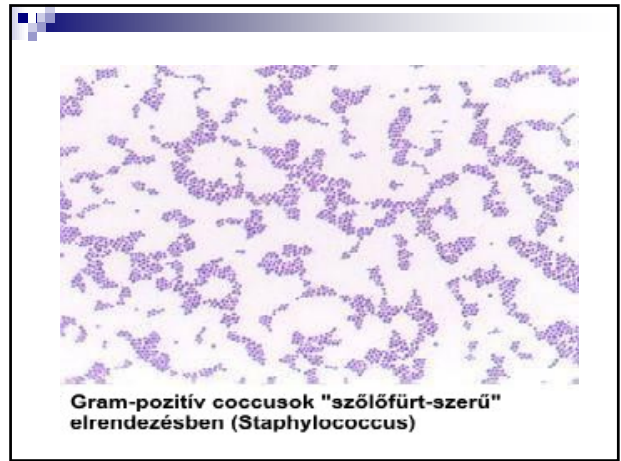
GRAM Festés (összetett festés)

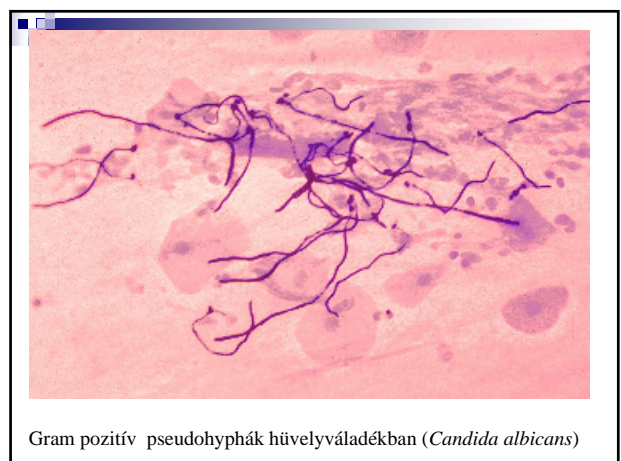
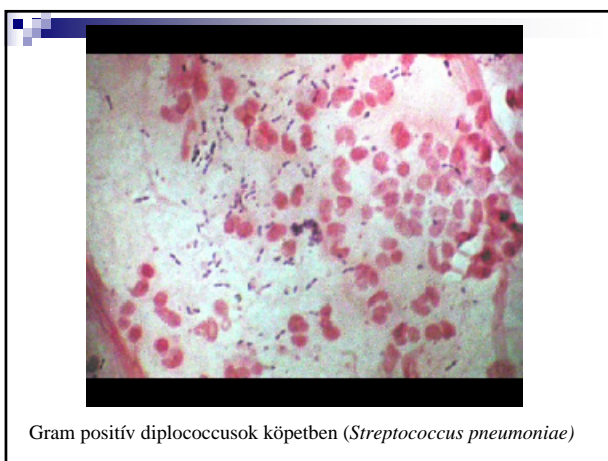
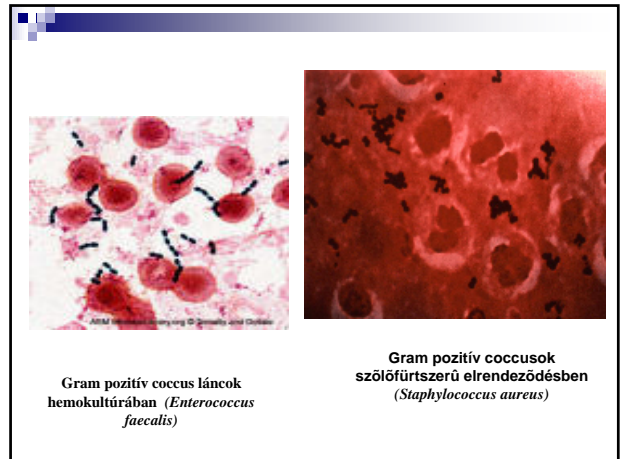
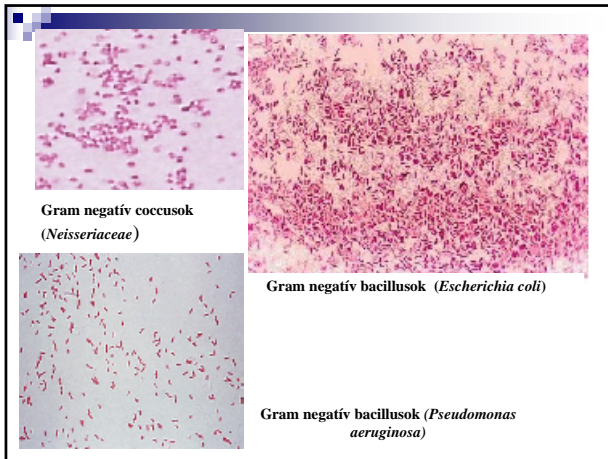
1. Fixált kenetet **kristályibolya-Na-oxalát** 1:4arányú keverékével 1 percig festünk
2. Leöntjük, csapvízzel öblítjük.
3. 1 percig **Lugol** oldattal festünk
4. Csapvízzel öblítünk
5. **96%-os alkohollal** színtelenedésig csepegtetjük
6. Csapvízzel öblítünk.
7. Carbol-fuchsinnal vagy **safraninnal** „ellenfestünk” (1 perc)
8. Szűrőpapírral szárítjuk
9. Olajimmerzióval vizsgáljuk

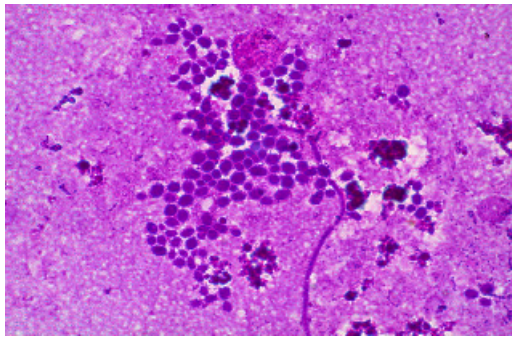
kristályibolya 2 perc
 Lugol oldat 1 perc
 alkoholos differenciálás
 safranin 2 perc

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

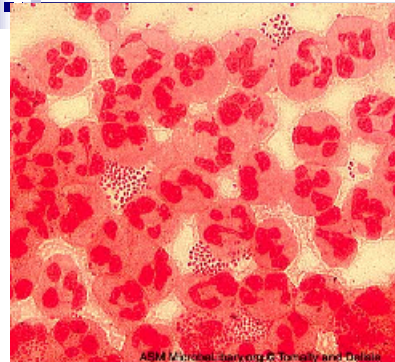
Gram-festés: a kristályibolya és a Lugol oldat (KI-ot tartalmazó jód oldat) egymásra hatásából keletkező jód-pára roszarni az alkoholos differenciálás kioldja a Gram-negatív baktériumokból (szaxitelemnek), azaz az utófestésre használt safranintól piros színűre színeződnek, míg a Gram-pozitívok színe (kötéltől) nem változik.



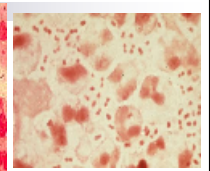




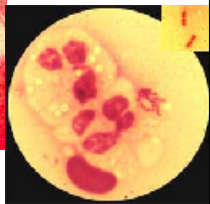
Gram pozitív sarjadzó gomba hüvelyváladékban (*Candida albicans*)



Neisseria gonorrhoeae húgycsőváladékban



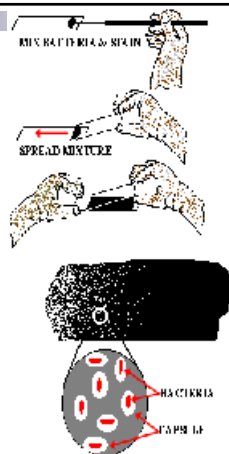
N. gonorrhoeae



Haemophilus ducreyi gennyben

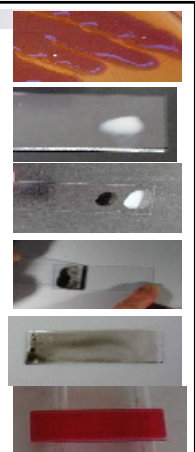
Tusfestés / Negatív festés

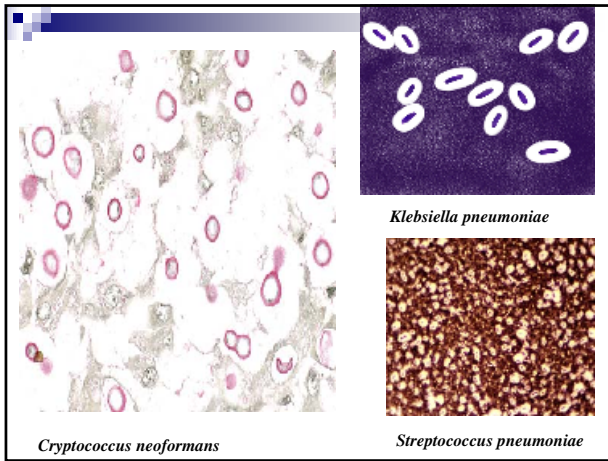
Tokos mikroorganizmusok vizsgálatára alkalmas. A készítményben a tuszemcsék kitöltik a mikroorganizmusok közötti teret, s azok tokja a fekete látóterben jól kirajzolódik.



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. Hövel fixáljuk.
7. Fuchsinnal festjük.
8. Csapvízzel mossuk.
9. Szobahőn szárítjuk.
10. Immerzióval vizsgáljuk.





This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.