

Mikroskopie v mikrobiologii & Mikrobiologická barvení

Prezentace pro obor:
Všeobecná sestra
Jan Smíšek © ÚLM 3. LF UK 2008

1

Mikroskopický průkaz infekčních agens

- Pro průkaz infekčních agens používáme jejich přímé pozorování pomocí
 - Světelné mikroskopie
 - Fluorescenční mikroskopie
 - Pozorování v temném poli
 - Metodu fázového kontrastu
 - Elektronové mikroskopie

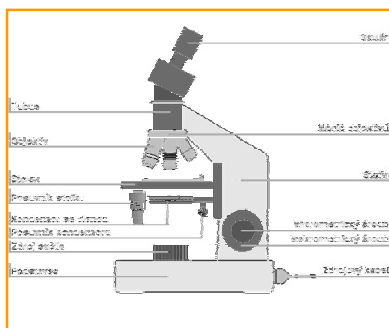
2

Světelná mikroskopie

- Světelný mikroskop je složené optické zařízení skládající se ze
 - Zdroje světla – žárovka
 - Posuvného reostatu, který reguluje světelný tok vycházející ze žárovky
 - Kondenzoru který soustřeďuje proud paprsků
 - Clony která upravuje jejich množství
 - Stolku na nějž upevňujeme řez umístěný na podložním sklíčku do speciální svorky
 - Objektivu, který zvětšuje obraz řezu a promítá ho směrem k okuláru
 - A ze samotného okuláru který obraz ještě více zvětšuje a jímž obraz pozorujeme

3

Světelná mikroskopie



4

Světelná mikroskopie

- Zaostření mikroskopu provádíme mikrometrickým šroubem, který se nachází z obou stran a posunuje polohu stolku se sklíčkem
- Polohu sklíčka upravujeme posuvnými šrouby, které sklíčkem upnutým ve svorce pohybují předozadně a pravolevě
- Běžná rozlišovací schopnost u světelného mikroskopu je 0,5 - 0,2 um

5

Světelná mikroskopie

- V mikrobiologii se nejčastěji používá běžného binokulárního mikroskopu
 - V parazitologii se používají objektivy se zvětšením 200-300 násobným
 - V bakteriologii pak se zvětšením 1000 a více násobným
 - Ve virologii se běžný světelný mikroskop používá jen zřídka např. při průkazu buněčných inkluzí v tkáních

6

Světelná mikroskopie

- Ve mikrobiologii se pro pozorování ve světelném mikroskopu používají
 - Nativní preparáty – zejména pro pozorování pohybu a dělení mikroorganismů. Tento druh preparátů je diagnosticky významný zejména v parazitologii.
 - Fixované preparáty – nejčastěji nátěry suspenze obsahující infekční agens barvené pomocí přehledných nebo diagnostických barvení.

7

Světelná mikroskopie

- Preparáty pozorujeme
 - Suchým optickým systémem
 - U něj je však limitováno dosažitelné zvětšení na 60-450x)
 - Imerzním optickým systémem
 - Na fixovaný a obarvený nátěr suspenze se kápne kapka kvalitního oleje a speciální imerzní objektiv se do něj ponoří (takto se v prostředí s dobrým indexem lomu u běžných mikroskopů možné zvětšení zvýší na 1050 násobné a vyšší)

8

Fluorescenční mikroskopie

- Fluorescenční mikroskop se od běžného světelného mikroskopu odlišuje hlavně zdrojem světla
- Ten vydává nejčastěji ultrafialové záření, které je po styku se speciálními barvivy (fluorochromy) absorbováno a vyzářeno jako viditelné světlo

9

Pozorování v temném poli

- Je speciální a již zřídka užívaný způsob mikroskopování používající speciální mikroskop, který pomocí doplňkové optiky odkloní zdroj světla od zdroje a umožní pozorování mikrobiálních částic zachycujících rozptýlené světlo v temném poli
- Rutinně se využívá při diagnostice syfilis

10

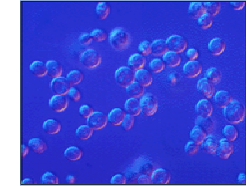
Metoda fázového kontrastu

- Je speciální druh mikroskopie, který používá clony pracující na principu tzv. fázové destičky, která mění vytváří ohybové spektrum
- To po průchodu pozorovanými mikrobiálními částicemi vytváří duhový efekt, který umožňuje pozorování nebarvených a nefixovaných preparátů

11

Metoda fázového kontrastu

- Tzv. nativní preparáty
 - používají se pro pozorování pohybových projevů a dělení mikrobů a dále v parazitologii



12

Elektronová mikroskopie

- Elektronový mikroskop se od světelného mikroskopu odlišuje rozlišovací schopností která je až 1000x větší tj. až 0,2 nm

13

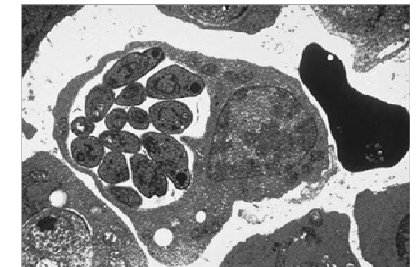
Elektronová mikroskopie

- Jednotlivé typy elektronové mikroskopie
 - TEM - Transmisní elektronová mikroskopie je nejstarší metodou EM a pracuje v analogii se světelným mikroskopem.
 - SEM - Skenovací elektronová mikroskopie umí zobrazovat povrchy objektů a jejich tvar

14

Elektronová mikroskopie

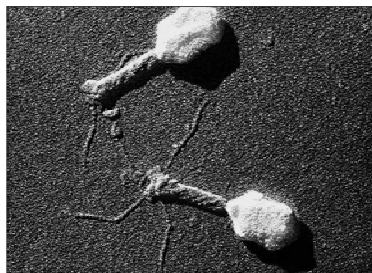
- Preparát TEM



15

Elektronová mikroskopie

- Preparát SEM



16

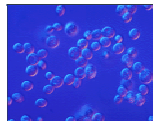
Elektronová mikroskopie

- V mikrobiologii (zejména ve virologii) se nejčastěji používají klasické TEM a SEM metody
 - Preparáty pro TEM se připravují jako jemně homogenizované suspenze nanášené na běžné elektronmikroskopické mřížce. Pro lepší zvýraznění se barví pokovením solemi kovů
 - Preparáty pro SEM se připravují značně rozličně podle svého konkrétního účelu

17

Příprava preparátu

- Nativní preparáty
 - Používají se zejména pro pozorování pohybu a dělení mikroorganismů
 - Tento druh preparátů je diagnosticky významný zejména v parazitologii
 - Velmi často se pozorují metodou fázového kontrastu

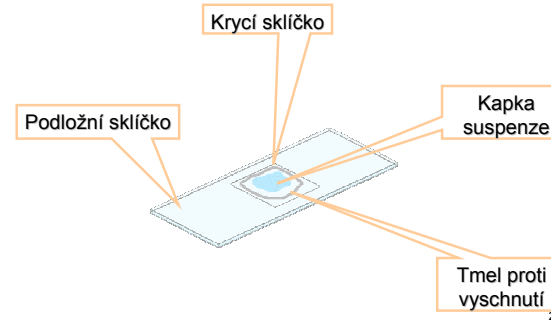


Příprava preparátu

- Nativní preparát připravíme pouze kápnutím suspenze mikroba na podložní sklíčko a překrytím krycím sklíčkem
- V případě, že chceme aby měl preparát delší trvanlivost musíme ho ochránit před vyschnutím přilepením okrajů krycího sklíčka

19

Příprava preparátu



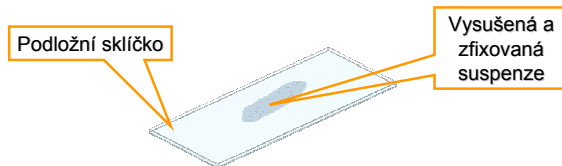
20

Příprava preparátu

- Fixovaný preparát připravíme kápnutím suspenze mikroba na podložní sklíčko a pomocí bakteriologické kličky ji rozmícháme ve středu sklíčka
- Takto připravené sklíčko na Bunsenovým kahanem vysušíme a zfixujeme 3x protažením sklíčka v plameni

21

Příprava preparátu



22

Příprava preparátu

- Tato metoda fyzikální fixace je nejpoužívanější
 - Existují i jiné metody – např. fixace chladem, chemická fixace methanolem a jiné
 - Používají se však méně

23

Příprava preparátu

- Takto připravené preparáty můžeme barvit přehlednými mikrobiologickými barvenými
- Po obarvení a vysušení jsou preparáty připraveny k pozorování suchým i imerzním systémem

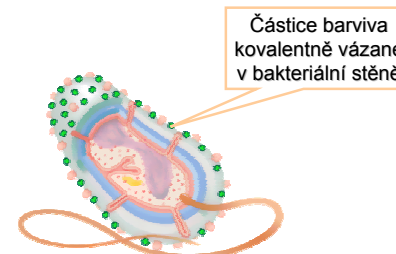
24

Princip barvení

- Metodika jednoduchých (orientačních) mikrobiologických barvení je založena zejména na afinitě barviv k bakteriálním komponentám
 - Např. Krystalvioleť barví snáze struktury, které neobsahují ve stěně mnoho nepolárních sloučenin

25

Princip barvení



26

Princip barvení

- U složitějších (diagnostických) barvení používajících více barviv je pak obarvení či neobarvení dané struktury dáno jejími vlastnostmi
 - Např. U Gramova barvení si původní obarvení krystalvioleť udrží pouze sloučeniny, které neobsahují ve stěně nepolární sloučeniny
 - Při oplachu acetonem dojde totiž k vymytí těchto struktur a tím i vymytí krystalvioleť

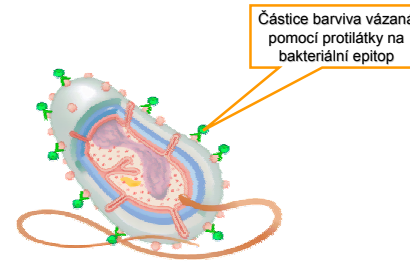
27

Princip barvení

- Moderní metodika v poslední době používaných barvení dává přednost umělému zvýšení afinity ke konkrétním strukturám navázáním barviva na protilátky
 - To umožňuje selektivní průkaz daných struktur v preparátu, což má značný diagnostický význam
 - Ve virologii už tento typ metodik převládá

28

Princip barvení



29

Diagnostická barvení

- Podle Grama:
 - Za normální teploty, běžnými koncentracemi.
 - Gram+ modré
 - Gram- červené
 - Gram labilní fialové
 - (buď vlastnost, nebo špatný preparát)
 - Barvivo: Krystalvioleť, Karbolfuchsin
 - Moření: Lugolův roztok
 - Odbarvení: Aceton

30

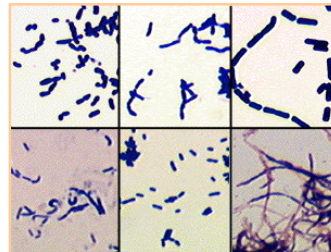
Diagnostická barvení

- Postup Gramova barvení:
 - 1. Na fixovaný preparát dáme pár kapek krystalvioletu
 - 2. Barvíme asi 20 sec
 - 3. Opláchneme Lugolovým roztokem
 - 4. Navrstvíme Lug. rozt. na 20 sec
 - 5. Slijeme a odbarvíme Acetonem asi 20(30) sec
 - 6. Dobarvíme Karbolfuchsinem 30 min
 - 7. Sušíme mezi dvěma listy filtračního papíru
 - 8. Pozorujeme imerzním systémem
- Výsledek:
 - Gram + modré
 - Gram neg. červené



Diagnostická barvení

- Výsledek Gramova barvení



32

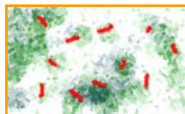
Diagnostická barvení

- Podle Ziehl - Neelsena:
 - Koncentrovanými barvivy, za tepla
- Slouží k znázornění acidorezistentních bakterií
 - = Mykobakterie (Kochův bacil – původce TBC)
- Preparát ze sputa (hlen, chrchle)
 - Barviva:
 - Karbolfuchsin (koncentrovaný).
 - Malachitová zeleň (1%)
 - Odbarvení: Kyselým alkoholem

33

Diagnostická barvení

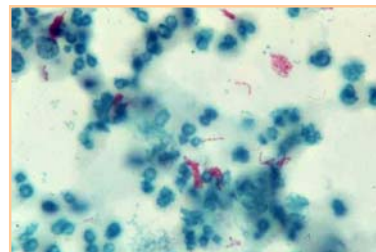
- Postup barvení podle Ziehl - Neelsena :
 - 1. Preparát zfixujeme 3x protažením v plameni.
 - 2. Přelijeme koncentrovaným Karbolfuchsinem 3-5 min
 - 3. Odbarvujeme v kyselém alkoholu.
 - 4. Opláchneme ve vodě.
 - 5. Dobarvíme malachitovou zelení 0,5-1 min.
 - 6. Opláchneme ve vodě.
 - 7. Sušíme vysoko nad kahanem.
 - 8. Pozorujeme imerzním systémem
 - Prohlédnout alespoň 50 zorných polí !!!
- Výsledek:
 - Acidorezistentní bakterie budou znázorněny červeně a zbytek bude zelený.



34

Diagnostická barvení

- Výsledek barvení podle Ziehl - Neelsena



35