

Baktériumok azonosításának alapjai, Mikroszkópos morfológia vizsgálatok

Készítette:
Dr. Tigyi Zoltán

2015

1

FEJEZET TARTALMA

TÉMA

Baktériumok azonosításának (identifikálásának) főbb lépései és a fénymikroszkópos vizsgáló módszerek, helye a folyamatban

Baktériumok azonosításában használatos főbb mikroszkópos morfológia vizsgálómódszerek

Steril munkavégzés alapjai

Gyakorlat menetrendje

Kenet készítés szilárd táptalajról

Egyszerű festés receptje

Baktérium mozgásának mikroszkópos vizsgálat

Gram-szerinti festés elmélete

Gram-szerinti festés folyamata

Különböző festett mikroszkópos kenetek fényképei

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK (IDENTIFIKÁLÁSÁNAK) FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Baktériumok azonosítása (**identifikálása**) az a folyamat, amelyben a baktérium fajtát, illetve némelykor a fajon belüli változatát (**törzs, izolátum, klón, patotípus**) állapítják meg .

Az identifikálás főbb okai:

1. Klinikai

- **felkészülés a megfelelő terápia alkalmazására** (pl. antitoxin adása, toxintermelő baktérium esetén)
- a **betegség klinikai lefolyásának előrejelzése**, főleg specifikus fertőzéseket okozó baktériumok esetén (*Neisseria meningitidis* - agyhártya gyulladás, *Streptococcus pneumoniae* – tüdőgyulladás)
- Gram negatív baktérium-véráram fertőzés – szepszis, endotoxin shock, stb. (lásd később)

3

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK (IDENTIFIKÁLÁSÁNAK) FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Az identifikálás főbb okai:

2. Labordiagnosztikai:

A baktérium **antibiotikum érzékenységének helyes értékeléséhez** szükséges a baktérium fajának ismerete, mivel így vehetőek figyelembe a **természetes** és **szerzett antibiotikum rezisztencia** mechanizmusok.
(lásd antibiotikum gyakorlat)

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK (IDENTIFIKÁLÁSÁNAK) FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

3. Közegészségügyi, járványügyi és kórházhigiénés:

Járványügyi intézkedések megtételének kiválasztása, pl.:

- **izoláció** (karantén) magas fertőző képességű kórokozó esetén (*Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria meningitidis* stb.)
- **antibiotikum profilaxis adása** a veszélyeztetetteknek
- **passzív** (gamma globulin) vagy **aktív immunizálás** (vakcina)
- **fertőzési lánc felderítése**, rezervoár, fertőzés forrása, vektora, közös közvetítő közege (lásd: járványügyi fogalmak)

5

FENOTÍPUS VIZSGÁLATOK

(feno-tipizálás)

- Jól növeszthető, baktériumok esetén, így humán kórokozók többségénél alkalmazható, mivel a **sejt életfolyamataiban résztvevő enzimek működésének kimutatásán alapul.**
- Új módszer a bakteriális **fehérjék profiljának tömegspektroszkópiai analízise.** Amely **percekre rövidíti le az identifikálást,** azonban ehhez is szükséges szintenyészet. Összességében 1 nappal rövidítheti az identifikálás idejét. (MALDI-TOF MS Matrix-assisted laser desorption / ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

6

KÓROKOZÓK AZONOSÍTÁSÁNAK ALAPMÓDSZEREI

GENOTÍPUS VIZSGÁLATOK

(geno-tipizálás)

- **Mesterséges táptalajokon nem tenyészthető** (pl. *Chlamydomyphila* fajok), **nehezen** (pl. bizonyos anaerobok) vagy **hosszú idő alatt tenyészthető baktériumok esetén** (pl. *Mycobacterium tuberculosis* stb.)
- Adott fajra **specifikus gének jelenlétének kimutatásán** vagy magának a **DNS szekvenciának az elemzésén** alapul.
- A feno- és a geno-típus vizsgálati módszerben a **kapott eredményeket adatbázisokhoz hasonlítva megállapítható a mikroorganizmus faja, főleg a genotípus vizsgálatok esetében, a fajon belüli változata is** (pl. melyik klón vagy patotípus).

7

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

AZ IDENTIFIKÁLÁS ESZKÖZEI

- A mikroba azonosítása egyedi tulajdonságai alapján.

Alap módszerek:

1, Mikroszkópos morfológiai vizsgálatok

- **natív** vagy **festett** készítmények vizsgálata különböző típusú fénymikroszkópokkal, amely segítségével a **festett készítmények esetén a mikrobák formájáról, elrendeződéséről, és festődési tulajdonságairól** szerzünk információt (részleteket lásd 23. diától)

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

2, Tenyésztés:

- Baktériumok **növekedési képességének vizsgálata** a tenyésztés különböző tápanyag és a fizikai feltételei között.
- A baktérium telepek **növekedési képességének vizsgálata** különböző táptalajokon pl. **alap táptalajokon** (véres agar, csokoládé agar stb.), illetve **diagnosztikai**, un. **differentiáló-szelektív táptalajokon** pl. eozin-metilénkék agar (részletek a "tenyésztés gyakorlaton"), illetve ezen **telepek morfológiai** megfigyelése fontos információ az identifikálás további lépéseinek megtervezéséhez

9

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

2, Tenyésztés:

- Főbb fizikai feltételek:
- pl. **optimális hőmérséklet** általában 37°C, de pl. *Campylobacter* fajok 42°C.
- **atmoszférikus tényezők**; oxigén jelenlétében (**aerob**) és nélkül (**anaerob**).
- Időtartam: **1-2 nap** gyorsan növő baktériumok esetén (pl. *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* fajok), de **anaeroboknál 2-10 nap**, lassan növő baktériumok esetén (pl. *Mycobacterium tuberculosis*) **4-8 hét** . (Lásd előadások.)

10

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

3, Biokémiai vizsgálatok:

A baktériumok **anyagcsere jellemzőinek vizsgálata** történik u.n. „biokémiai táptalajokon” (BT), amelyek alkalmasak a baktérium sejt metabolikus működésének jellemzésére. Adott BT-n **adott anyagcsere folyamatban lévő enzim meglétét vagy hiányát lehet kimutatni, amely az adott fajra újlennyomat szerűen jellemző.**

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

3, Biokémiai vizsgálatok:

A kellő milyenségű és mennyiségű vizsgálatból **kapott eredmények adatbázissal történő összevetésével meghatározható a baktérium faja.** Amely történhet manuálisan, de automatával is.

(Részletek a "tenyésztés, illetve identifikálás" gyakorlatokon.)

Időtartam: **manuális módon** gyorsan növő baktériumok esetén **1-2 nap.**

Automatikus identifikáló rendszerrel gyorsan növő baktériumok esetén lehet akár **3-6 óra.**

12

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

4, Szerológiai próbák

A mikrobiális felszíni antigének, kimutatása specifikus immunsavókkal.

Bizonyos esetekben, azonnali diagnózishoz lehet jutni, legalább nemzetségig (genus) némelykor faj szintig. Gyakran használják **biokémiai módon történő** **identifikálás kiegészítésére pl. szerológiai típus (szerotípus)** megállapítására pl. O, H és K antigének esetén.

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK FŐBB MÓDSZEREI ÉS LÉPÉSEI

Alap módszerek:

4, Szerológiai próbák

Időtartam: módszertől függő, pl. **tárgylemez-, latex gyöngy agglutináció 2-3 perc**, ezért a laboratóriumi diagnosztikában sok „**gyors**” vagy „**betegágy mellett végezhető**” **tesztek** alapjául szolgálnak.

- Agaróz immundiffúziós módszereke akár napokig is tarthatnak.

(További részletek a szerológiai gyakorlatokon és előadáson.)

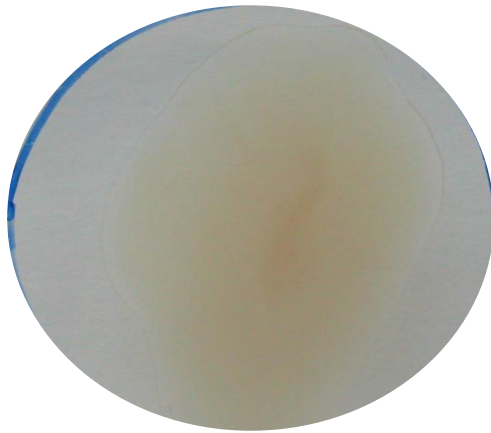
A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

Gyakran szükséges a faj szint alatti (fajon belüli), további identifikálás pl. **patotípusok** azonosításakor, mivel ezen esetben a kórokozó és a nem kórokozó baktérium **biokémiai identifikálással nem különböztethető** meg pl. *Escherichia coli* patotípusok. (Részletek az előadásokon.)

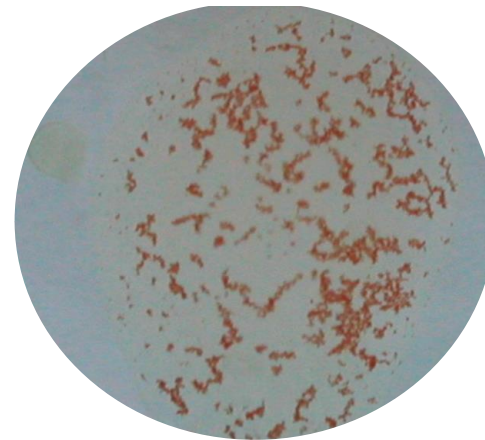
5, Patogenitási faktorok vizsgálata

Olyan faktorok, amelyek a baktérium betegség okozó képességét okozzák, illetve növelik, pl. exotoxinok, exoenzimek termelése (coagulase), adhezinek, haemagglutininek, stb.)

3-as típusú fimbria kimutatása marha vörösvértestekkel



Negatív



Pozitív

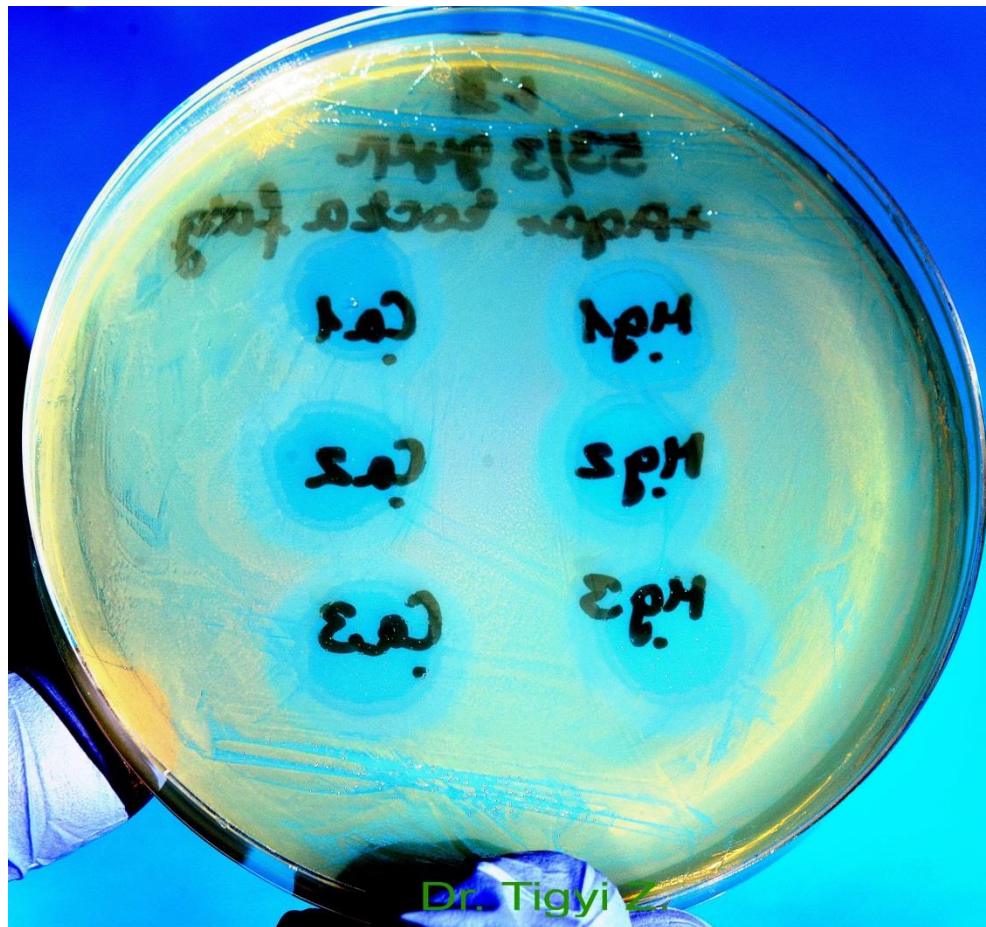
A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

6, Bakteriofág tipizálás

- Epidemiológiai vizsgálatkor szükséges lehet **fajon belüli azonosításra**, a különböző mintákból származó izolátumok közötti azonosságok vagy különbségek kimutatására.
- A bakteriofág fertőzése specifikus receptor-ligand kölcsönhatáson alapul. A különböző fágok un. **fágoldási mintázatának összehasonlításával eldönthető**, hogy az izolátumok azonos eredetűek-e. Ha azonos eredetűek az izolátumok akkor azonos fágokra mutatnak érzékenységet.

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

6, Bakteriofág tipizálás, *Staphylococcus aureus* izolátumon



18

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

7, Bakteriocin tipizálás

(Bakteriocin= baktérium által termelt, peptid vagy fehérje, amely azonos vagy rokon fajon fejt ki baktérium pusztító hatását.)

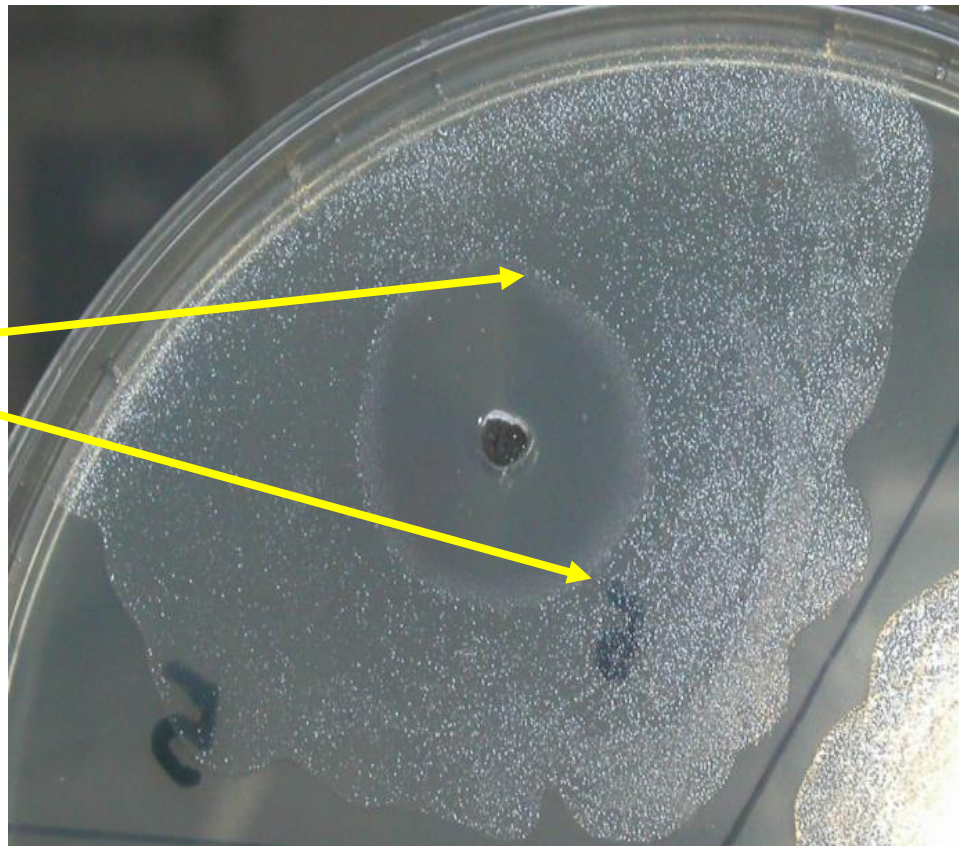
- **Receptor-ligand kölcsönhatáson alapul.**
- Az izolátumok által termelt bakteriocin típusa, illetve más bakteriocinekkal szembeni **érzékenységi mintázatuk alapján fajon belüli azonosításra alkalmas módszer.**
- A különböző mintákból származó izolátumok a fent leírt tulajdonságainak összehasonlításával eldönthető, hogy van-e közöttük járványügyi kapcsolat.

19

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

7, Bakteriocin tipizálás

Bakteriocin
gátlási zóna



A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSÁNAK KIEGÉSZÍTŐ MÓDSZEREI

8, Nukleinsav alapú módszerek, geno-tipizálás

Mesterséges táptalajokon nem tenyészthető (pl. *Chlamydomophila* fajok), nehezen (pl. bizonyos anaerob baktériumok) vagy hosszú idő alatt tenyészthető mikroba-
esetén (pl. *Mycobacterium tuberculosis* stb.)

- Faj és faj szint alatti identifikálás is végezhető, akár tenyészet nélkül közvetlenül klinikai mintából is.

8, Nukleinsav alapú módszerek, geno-tipizálás

- Mivel ezen módszerek adataiból **több adatbázist is létre hoztak** pl. PulsNet-et a Pulzáló mezejű gél elektroforézis (**PFGE**) esetén, „multilokusz” szekvencia típusok adatbázisát (**MLST**)-hez, illetve „egyéb” szekvenciák részére „**génbakok**” vannak, ezért jól alkalmazhatóak **epidemiológiai, járványügyi vizsgálatokban az izolátumok közötti rokonság, azonosság mértékének megállapításához, amely segítségével eldönthető, hogy járványról vagy véletlenszerű halmozódásról van-e szó.** (További részletek a molekuláris biológiai gyakorlatokon.)

22

FŐBB FÉNYMIKROSKÓPOS MORFOLÓGIAI VIZSGÁLÓMÓDSZEREK

Fénymikroszkópos

Natív készítmény



Fénymikroszkóp

- sötétlátóteres
- fáziskontraszt, stb.

- az élő, festetlen sejtek láthatóvá tétele

Festett készítmény

Egyszerű festés:

- metilénkék
- fukszin stb.

- a baktérium sejtek formájának láthatóvá tétele

Differenciáló festés:

- Gram-festés
- Ziehl-Neelsen féle saválló festés

- a baktériumok festődés szerinti csoportosítása



sejtfal szerkezete

NATÍV KÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA

Natív készítmények:

- A diagnosztikában csak szűk területen használják, mivel speciális mikroszkópok szükségesek hozzá és relatíve kevés, a diagnosztikában felhasználható információt adnak. Előnyük, hogy a **baktériumokat élő formában lehet megfigyelni.**

Sötétlátóteres mikroszkóp:

- Speciális kondenzort és oldal irányú megvilágítást igényel, így csak a tárgyról szóródó fény jut a mikroszkópba.

- Előnye, hogy **igen jó a feloldó képessége** $0,02 \mu\text{m}$, szemben a világos látóterű $0,2 \mu\text{m}$ -el. Így a világos látóterű fénymikroszkóppal alig, vagy nem látható vékony spirochaeta baktériumok is láthatóak. Klinikai mintákban, olyan kórokozók, mint a szifiliszé *Treponema pallidum*, Lyme-kóré *Borrelia burgdorferi*, leptospriózisé *Leptospira icterohaemorrhagiae* láthatóvá válnak.

(További részletek biofizika, biológia tantárgyakban.)

NATÍV KÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA

Fáziskontraszt mikroszkóp:

- **Előnye**, hogy kép igen kontrasztos, ezért különösen jól használható nagyon vékony (0,1-1 μm), festetlen metszetek vizsgálatára.
- **Hátránya**, hogy különösen az erős kontrasztot adó struktúrák körül fényudvar (halo) keletkezik, amely zavarja a képképzést.
- Speciális kondenzort és ún. fázis gyűrűt és, az objektív felett ún. fázis lemezt igényel. A fény polarizált tulajdonsága és a biológiai struktúrák optikai sűrűség különbsége miatti hullám fázis eltolódását felerősítve jön létre a kép.
(További részletek biofizika, biológia tantárgyakban.)

FESTETT KÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA

Egyszerű festés:

A baktériumokat **egy féle festéssel festik** pl. metilénkék vagy fukszin stb.

- A baktériumok **alakját, méretét** vizsgálhatjuk közönséges világos látóterű fénymikroszkóppal.
- **Előnye**, hogy gyors és olcsó módszer.
- **Hátránya**, hogy a baktérium sejtfal típusáról nem ad információt, amely ismerete diagnosztikai és terápiás okokból is fontos.

FESTETT KÉSZÍTMÉNYEK VIZSGÁLATA

Differenciáló festés:

A baktériumokat legalább **két festéssel festik**, és **egy differenciáló oldatot** használnak, amely egyes sejtfal szerkezeti molekulákból hatékonyabban oldja ki a festéket, mint más sejtfal szerkezeti molekulákból. A második festék az elszíntelenedett sajtfalú sejteket festi meg.

- **Előnye**, hogy **az alaktani információk mellett, a sejtfal szerkezetéről is ad információt.**

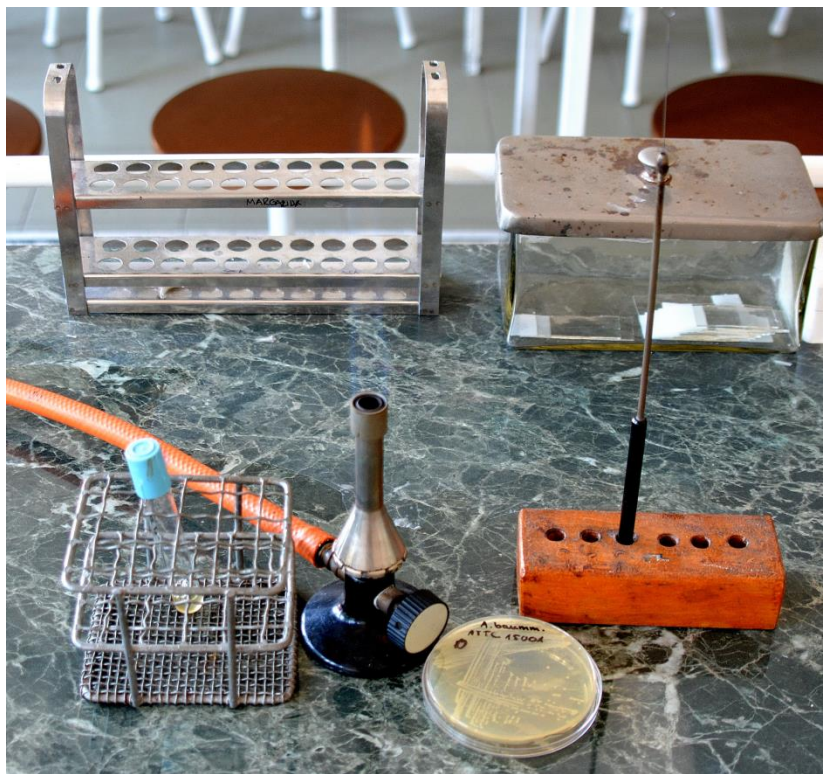
- **Hátránya**, hogy egyes festékek, és oldatok toxikusak. pl.: Gram-festés, Ziehl-Neelsen féle saválló festés

- **A Bunsen-égő 30 cm-es körzetében kell dolgozni**, mivel itt a levegő felfelé áramlik, így a megakadályozza levegőből történő kontaminációt.
- **Minden használat előtt és után a fém oltókacsot (oltóhurok) Bunsen-égő lángjában izzásig kell melegíteni.** A tenyészethez érintése előtt hagyni kell kihűlni, kb. 20 mp-ig.
- **A tenyészeteket tartalmazó kémcső száját, a dugó kivétele után és visszadugaszolása előtt, le kell égetni.**
- **A nyitott kémcsövet kb. 45-fokos szögben kell tartani**, mert így a levegőből történő kontamináció esélye csökkenthető.
- **A kémcső szájának leégetése nem a sterilizálás miatt történik**, hanem kémcső szája körüli feláramló meleg levegő csökkenti a kontamináció esélyét.

- Munka közben **kémcsövet a bal kezünkben tartjuk** (jobb kezesek) az **eszközöket** (oltóhurok, pipetta stb.) a **jobb kezünkben tartjuk**.
- A kémcső dugóját a **jobb kezünk kis- és gyűrűs-ujjával fogjuk meg és húzzuk ki, majd tartjuk a kezünkbe, amíg a csővel dolgozunk**.
- **A dugót tilos az asztalra tenni**, mert a környezetet kontaminálhatjuk és viszont a tenyészetet is a környezetből.
- **A munka után a kémcsőszájának lángba tartása után a dugót azonnal visszatesszük a kémcső szájába**.
- A Petri-csésze teteje megakadályozza a kontaminációt, azért **a tenyészetet a munka elvégzése után mindig a tetejébe kell visszahelyezni, a kontamináció veszélye miatt**.

STERIL MUNKAVÉGZÉS ALAPJAI

Munka a **Bunsen-égő 30 cm-es közelében történik.**
A kacsot használat előtt és után izzításig hevítjük.



31

STERIL MUNKAVÉGZÉS ALAPJAI

- A tenyészet kupakját kisujjunkban tartjuk, az asztalra nem tesszük le.
- A cső száját egy pillanatra lángja tartjuk.



32

STERIL MUNKAVÉGZÉS ALAPJAI

- A munka végzése alatt a kémcső kupakját kisujjunkban tartjuk, az asztalra nem tesszük le, a kontamináció elkerülése miatt.



AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSZŐKATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK
ERŐSÍTÉSÉRE

TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

FELADATOK:

I. Nap

1. Egyszerű festés.

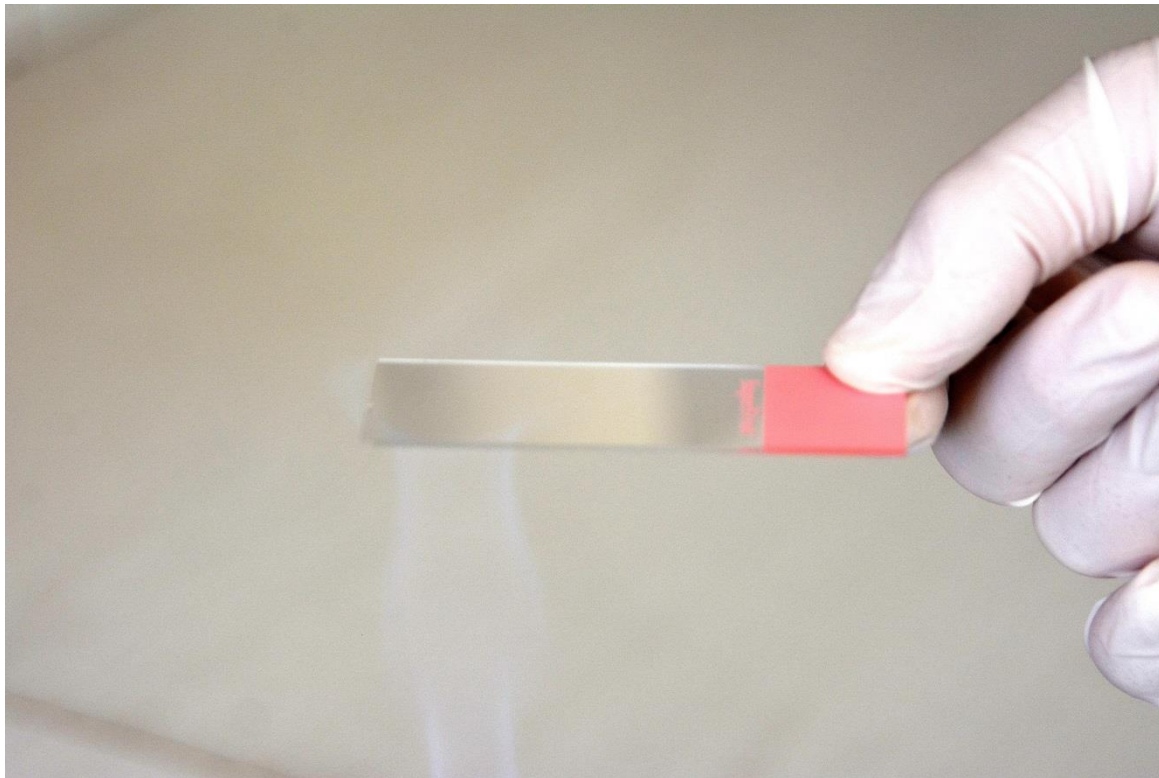
II. Nap:

2. A baktériumok mozgásának vizsgálata, natív készítmény.

3. Differenciáló vagy összetett festés, Gram-festés.

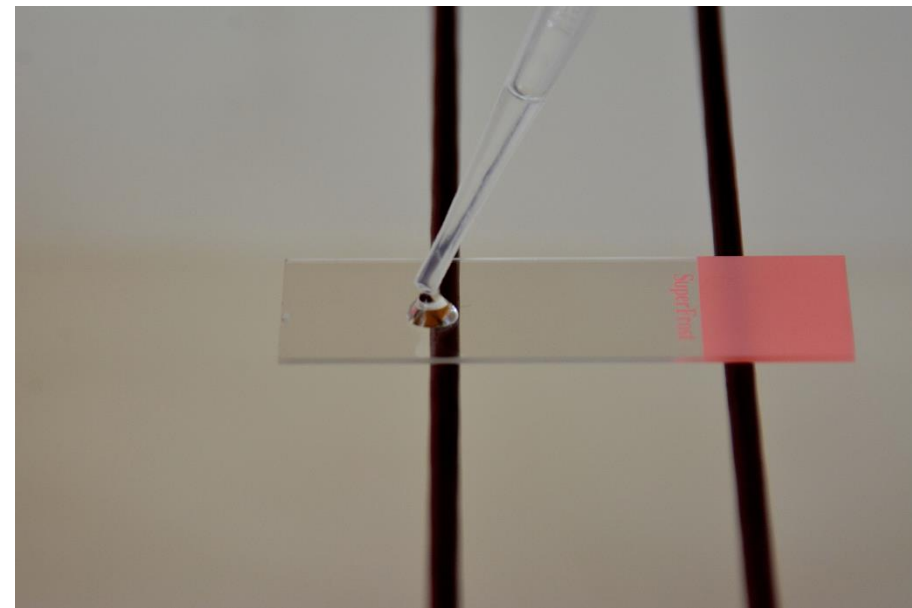
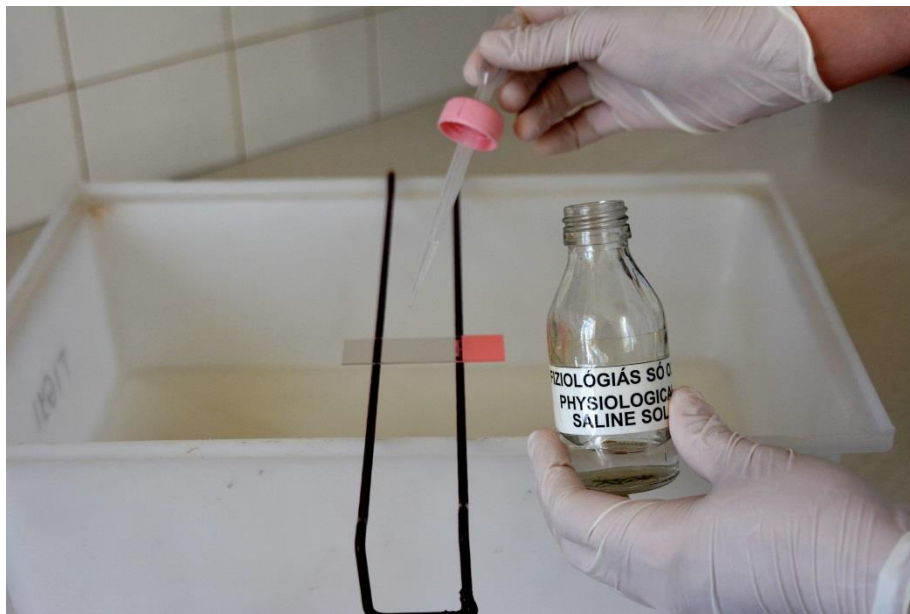
MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

1. Tárgylemez zsírtalanítása a Bunsen lángon háromszor történő áthúzásával.



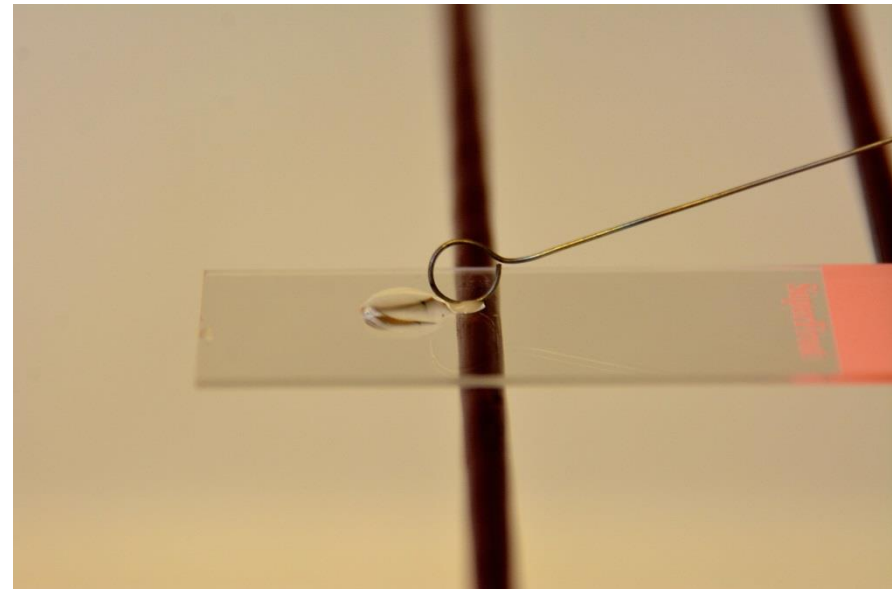
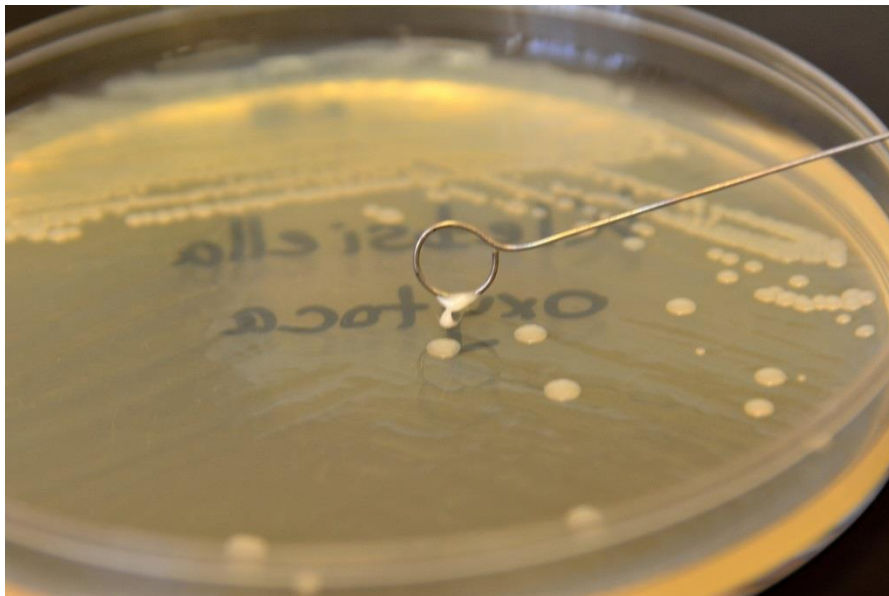
MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

2. 1 csepp fiziológias sóoldatot kell cseppenteni a tárgylemez közepére.



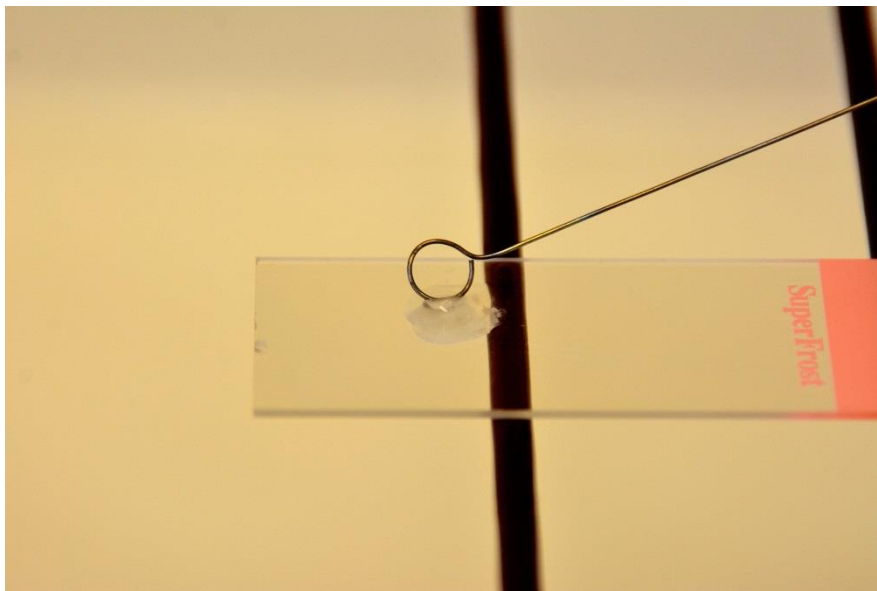
MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

3. **Szuszpenzió készítés:** A lánggal sterilizált és visszahűtött hurok külső részére 1 kb. mákszemnyi tenyészetet veszünk fel, majd a baktériumokat a csepp mellé helyezzük.



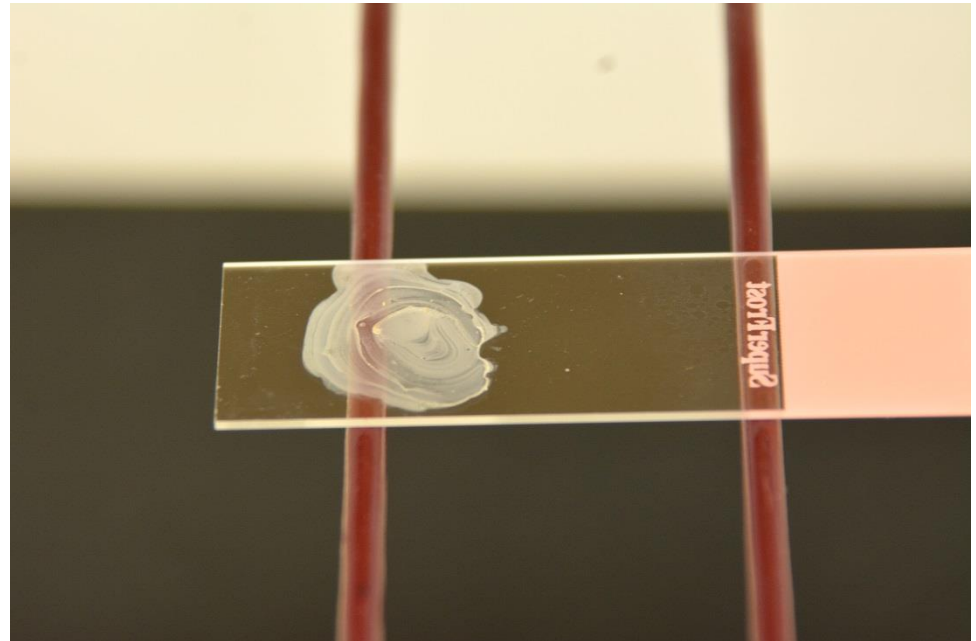
MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

3. Szuszpenzió készítés: A kacs körkörös mozgatásával fokozatosan összekeverjük, és egyenletes, csomó mentes szuszpenziót készítünk.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

4. Szárítás levegőn: Tilos közvetlenül lánggal szárítani!
Azonban, a láng felett kb. 30 cm-re tartva a kenetet a feláramló meleg levegőbe tartva a száradás gyorsítható.



39

MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: KENET KÉSZÍTÉS

5. **Hővel fixálás:** A kenetet háromszor áthúzzuk a láng felett, hogy a festés alatt a baktérium sejtek ne ázzanak le a tárgylemezről.



40

Egyszerű festés

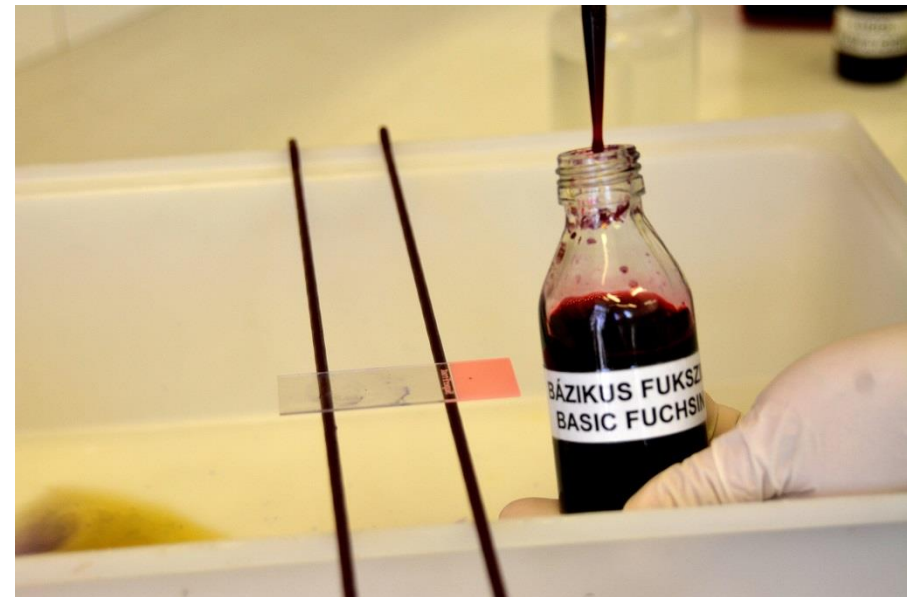
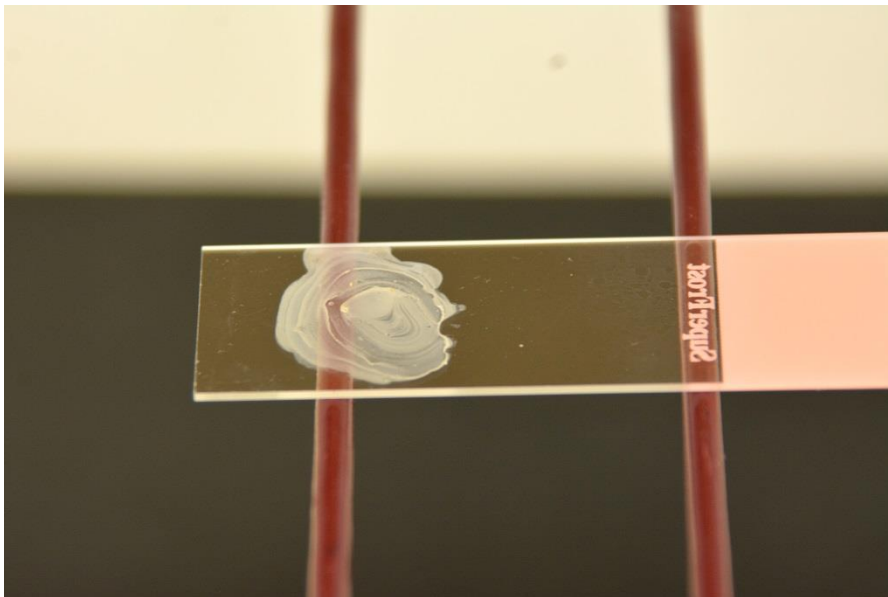
Anyagok, eszközök:

- Tenyészetek táp agar lemezen: *Escherichia coli*; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus* és *Candida albicans* szilárd táptalajon
- fiziológiás sóoldat; tárgylemez; festőállvány; metilénkék vagy fukszin; oltókacs; Bunsen-égő; mikroszkóp, Immerziós olaj, itatós papír.

MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

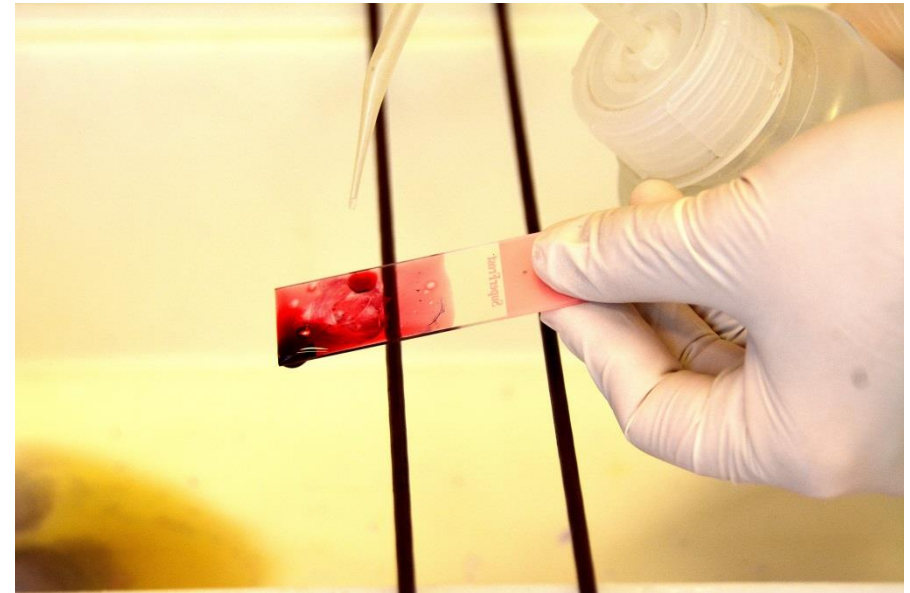
- A hővel fixált kenetet a festőállványon **vagy** fukszin, vagy metilénkék oldattal 3 percig festjük.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

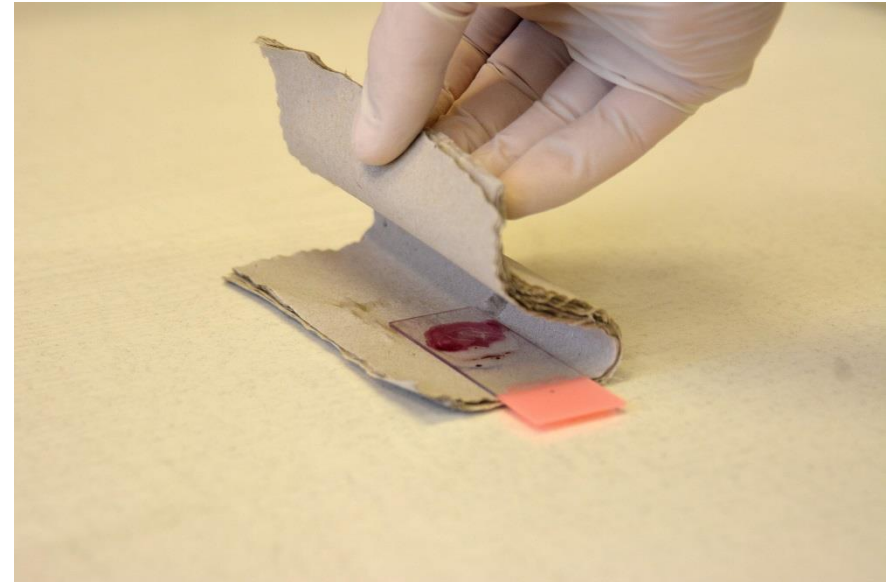
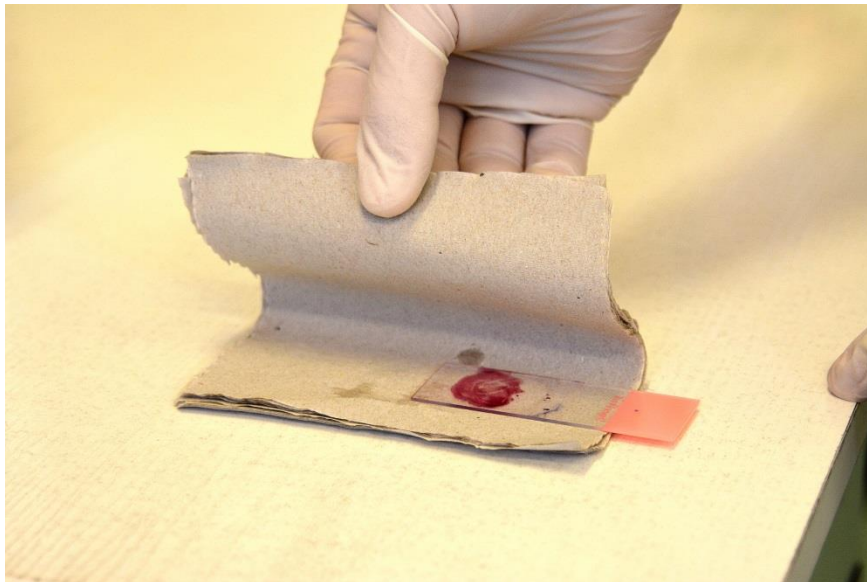
- Fukszin, vagy metilénkék oldattal 3 percig festjük.
- Vízzel óvatosan lemossuk a festéket.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

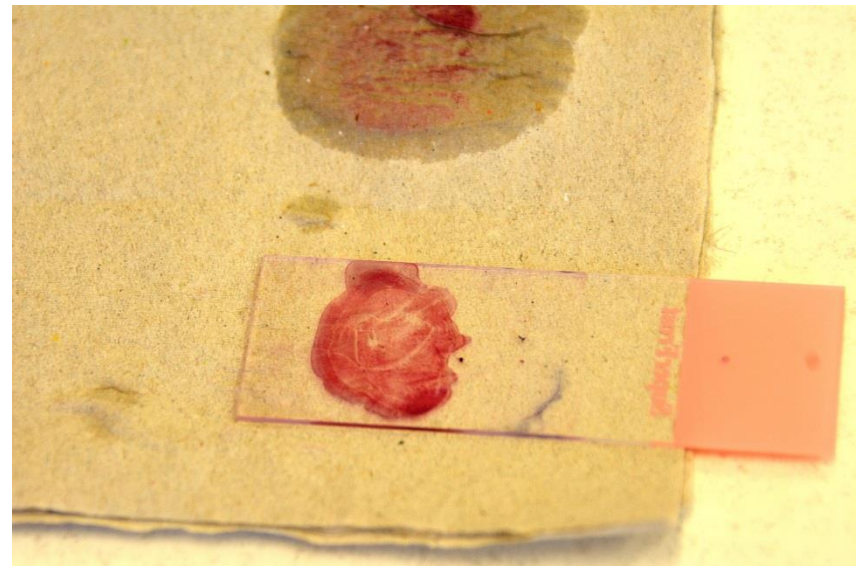
- A felesleges vizet leöntjük, majd a kenetet az asztalra helyezett papírvatta csíkra tesszük, majd egy másik papírvatta csíkkal leitatjuk. **Törölni TILOS!**



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

- Törölni TILOS, mert a baktériumokat is letörölhetjük. Majd hagyjuk megszáradni.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

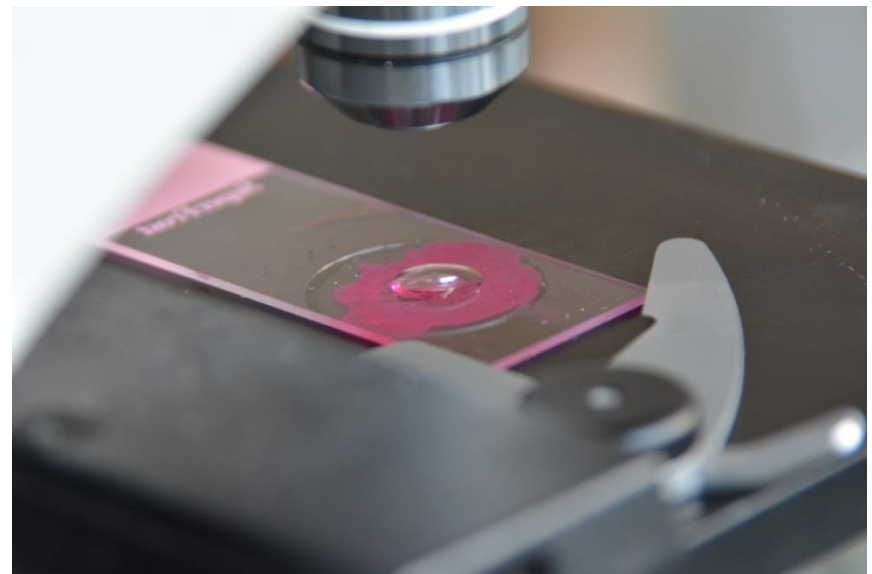
- Mikroszkópizálás: A kenetre **1 csepp immerziós-olajat cseppenünk, majd 100x-os nagyítású immerziós-objektívvel** vizsgáljuk.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

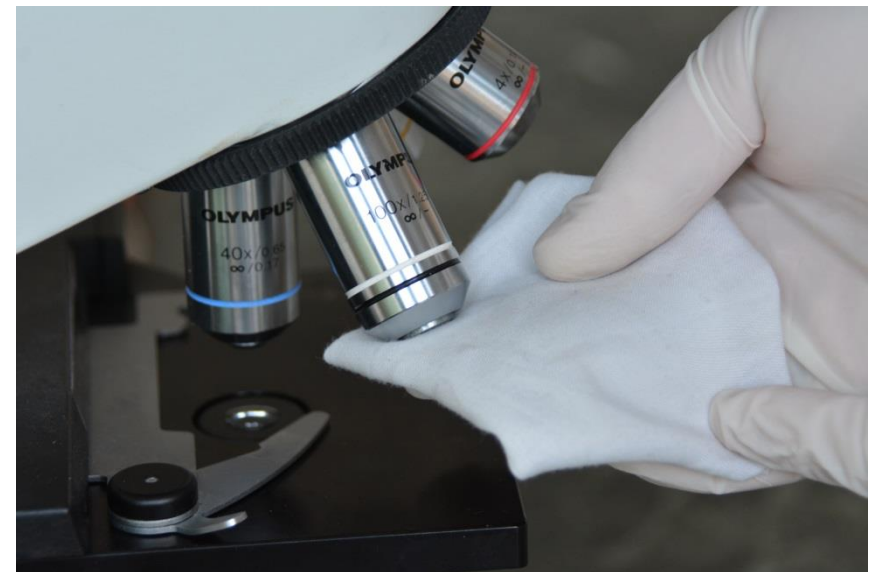
- Mikroszkópizálás: A kenetre 1 csepp immerziós olajat cseppenünk, majd 100x-os nagyítású immerziós objektívvel vizsgáljuk.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

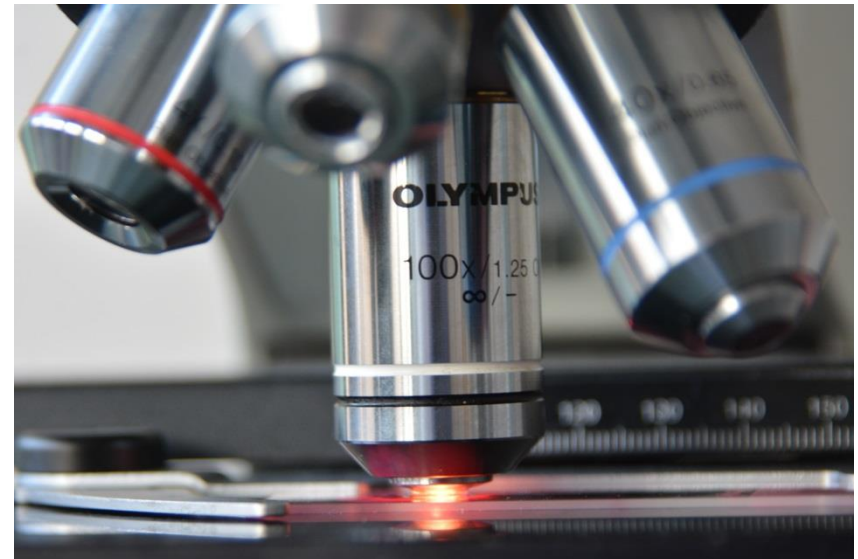
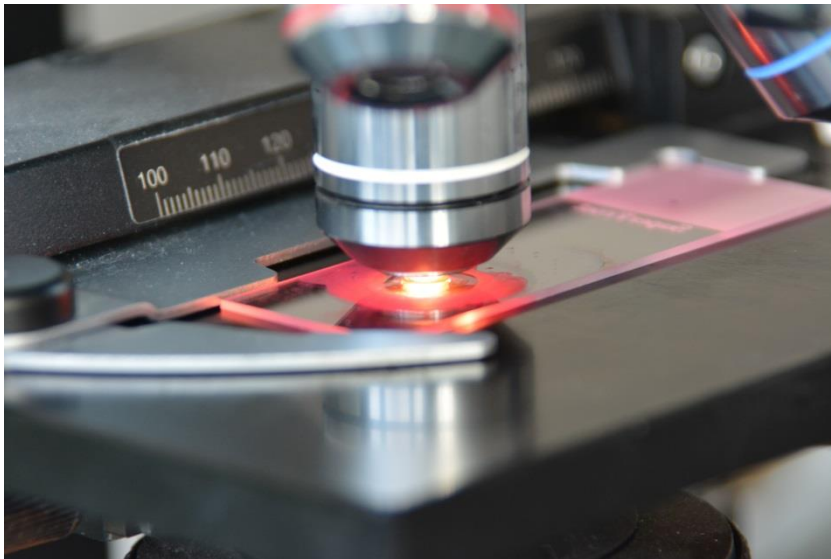
- Használat után a mikroszkóp frontlencsáját rongyra cseppentett xylollal letöröljük. A mikroszkópra visszahelyezzük a porvédőt.



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK: EGYSZERŰ FESTÉS

Egyszerű festés menete:

- A frontlencsét a tárgylemezhez közelítjük óvatosan, hogy az immerziós olajba merüljön és éppen, hogy éppen érintse a tárgylemezt. A mikrométer csavarral lassan távolítjuk az objektívet miközben az éles képet keressük.



FELADATOK:

II. Nap:

2. A baktériumok mozgásának vizsgálata, natív készítmény.

3. Differenciáló vagy összetett festés, Gram-festés.

A baktériumok **mozgásának** vizsgálata,
natív készítmény.

- **A csillós baktériumok megfelelő körülmények között képesek helyzetváltató mozgásra, amely irányított, legtöbbször egy adott kémia anyag koncentrációja által.** Iránya lehet a koncentráció irányába pl. tápanyag, oxigén, vagy azzal ellentétes.
- **A baktérium sejt aktív mozgásának határozott iránya van, míg a molekulák hő okozta mozgása, a Brown-féle mozgás, inkább rezonanciához hasonlít és nincs határozott iránya.** Sokszor a készítmény kiszáradása a folyadékfilm mozgását okozza, ekkor minden sejt egyszerre egy irányba áramlik.

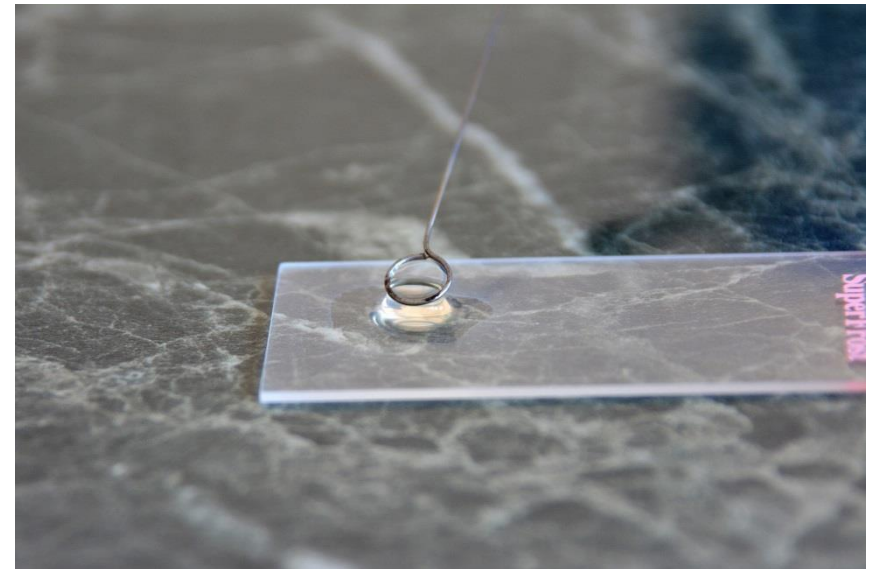
51

A baktériumok **mozgásának** vizsgálata,
natív készítmény.

- A csillós baktériumok egy része, képes rajzásra, ez a szilárd táptalaj felszínén történő vándorolást jelenti. Ehhez a tulajdonsághoz a csilló géneken kívül további gének is szükségesek, így nem minden csillós baktérium képes rajzásra.
- Figyeljük meg a *Proteus* tenyészet felszínén a rajzást.

A baktériumok **mozgásának** vizsgálata, natív készítmény.

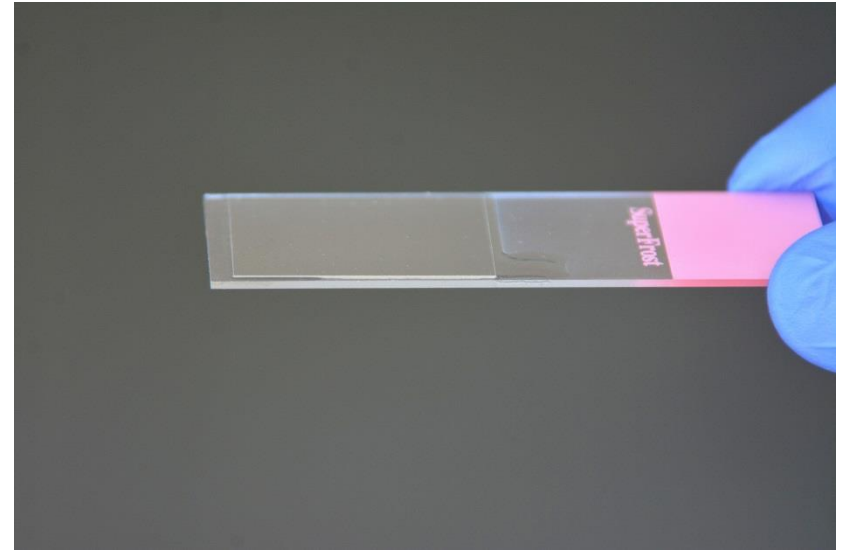
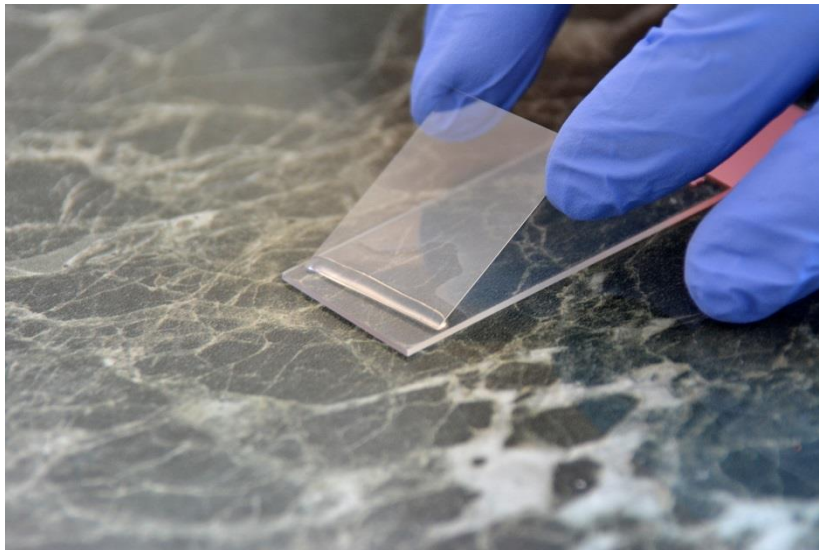
1. Sterilen kell dolgozni! Folyékony tenyészetből 3-5 oltókacsnyi tenyészetet kell a tárgylemez közepére helyezni. Csak a zárt hurkú oltókacs alkalmas a folyadék film felvételére. Minden alkalommal a kacsot le kell égetni.



53

A baktériumok **mozgásának** vizsgálata, natív készítmény.

2. A tenyészet lefedése fedőlemezzel, úgy, hogy először a fedőlemez élén hagyjuk a csepp elfutását, majd fokozatosan közelítjük a ujjunk felőli oldalát a tárgylemezhez, majd „ráejtjük” a fedőlemezt a cseppre. Ha megfelelően dolgozunk, akkor nem vagy csak minimális buborék lesz a fedőlemez alatt.

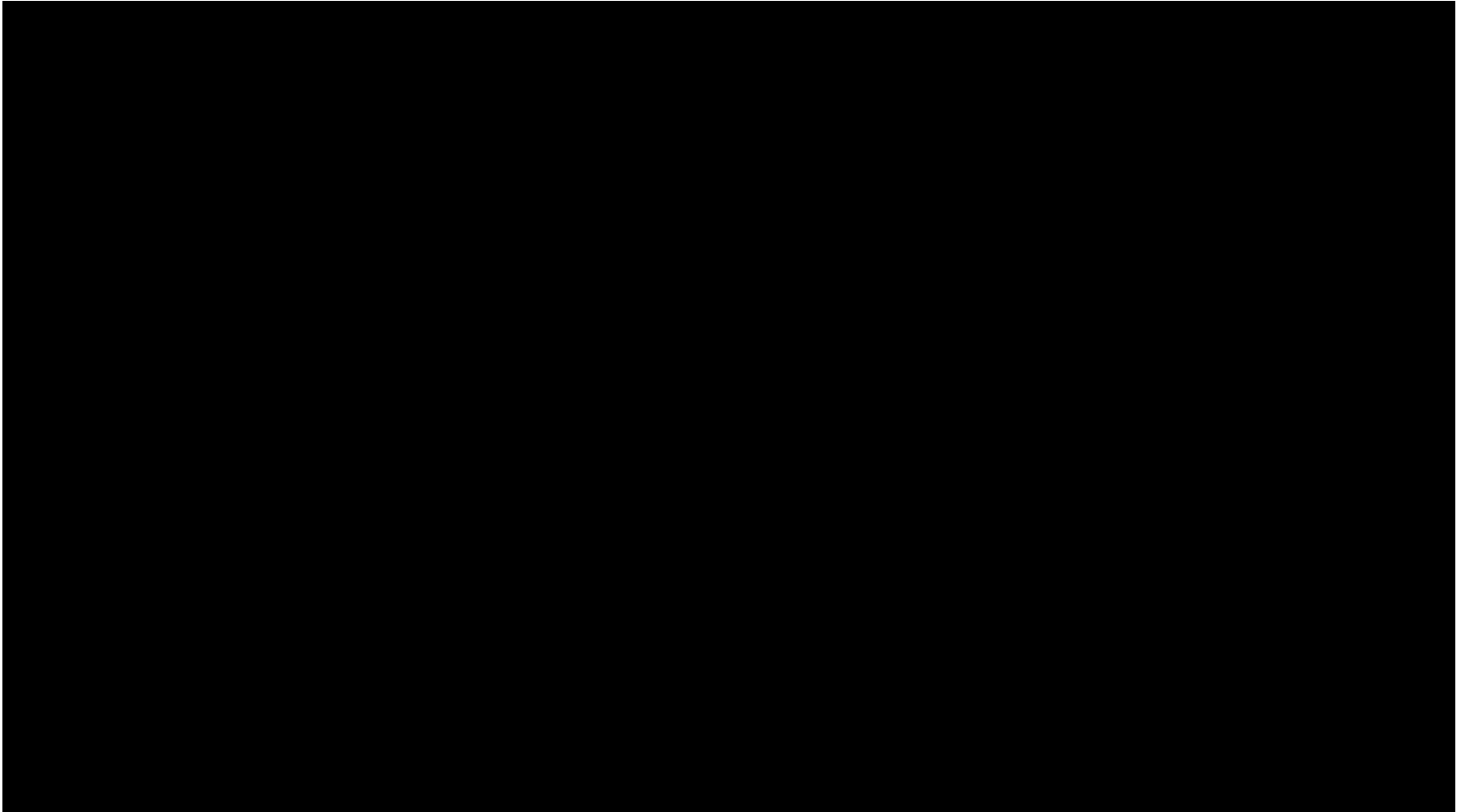


A baktériumok **mozgásának** vizsgálata,
natív készítmény.

3. 40x-es frontlencsével vizsgáljuk, beszűkített diafragmával.
Látóterenként 3-4 aktívan mozgó baktériumra számíthatunk.
A többség Brown-mozgást végez.



A baktériumok mozgásának vizsgálata, video.



56

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSZŐKATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK

ERŐSÍTÉSÉRE

TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

Hans Christian Joachim Gram, (1853 - 1938)
Dán bakteriológus,
- Festési eljárás publikálása 1884 Berlin



-Forrás:

-http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/christian_gram.htm

- A festési módszere lehetővé tette a baktériumok osztályozását.

57

Gram-szerinti festés.

1. **ALAP FESTÉS**: Gentiana-ibolyával (kristályibolya) a sejtek ibolya színűre festődnek.
2. **„PÁCOLÁS”, KOMPLEX KÉPZÉS**: Gram-féle jód oldat (lugol oldat) pácként szolgál, mivel **vízben oldhatatlan komplexet alkot a jód a festékekkel és a peptidoglikánnal.**



A jód-festék-sejtfal peptidoglikán komplex kialakulása a baktérium sejtfalában.



Gram (+)

20 - 100 peptidoglikán réteg



Gram (-)

1-2 peptidoglikán réteg

58

Gram-szerinti festés

3. DIFFERENCIÁLÁS, SZÍNTELENÍTÉS: acetone-alkohol
Azonos idő alatt azonos mennyiségű festék oldódik ki.



Gram (+)

ibolya színű marad.

20-100 peptidoglikán réteg



Gram (-)

elveszti a színét

1-2 réteg peptidoglikán

Ha túldifferenciáljuk a Gram (+) baktériumot az is elveszti a színét és Gram(-) baktériumnak tűnik!!!

4. UTÓFESTÉS, ELLENFESTÉS: fuchsin vagy safranin



Gram (+)

ibolya színű marad



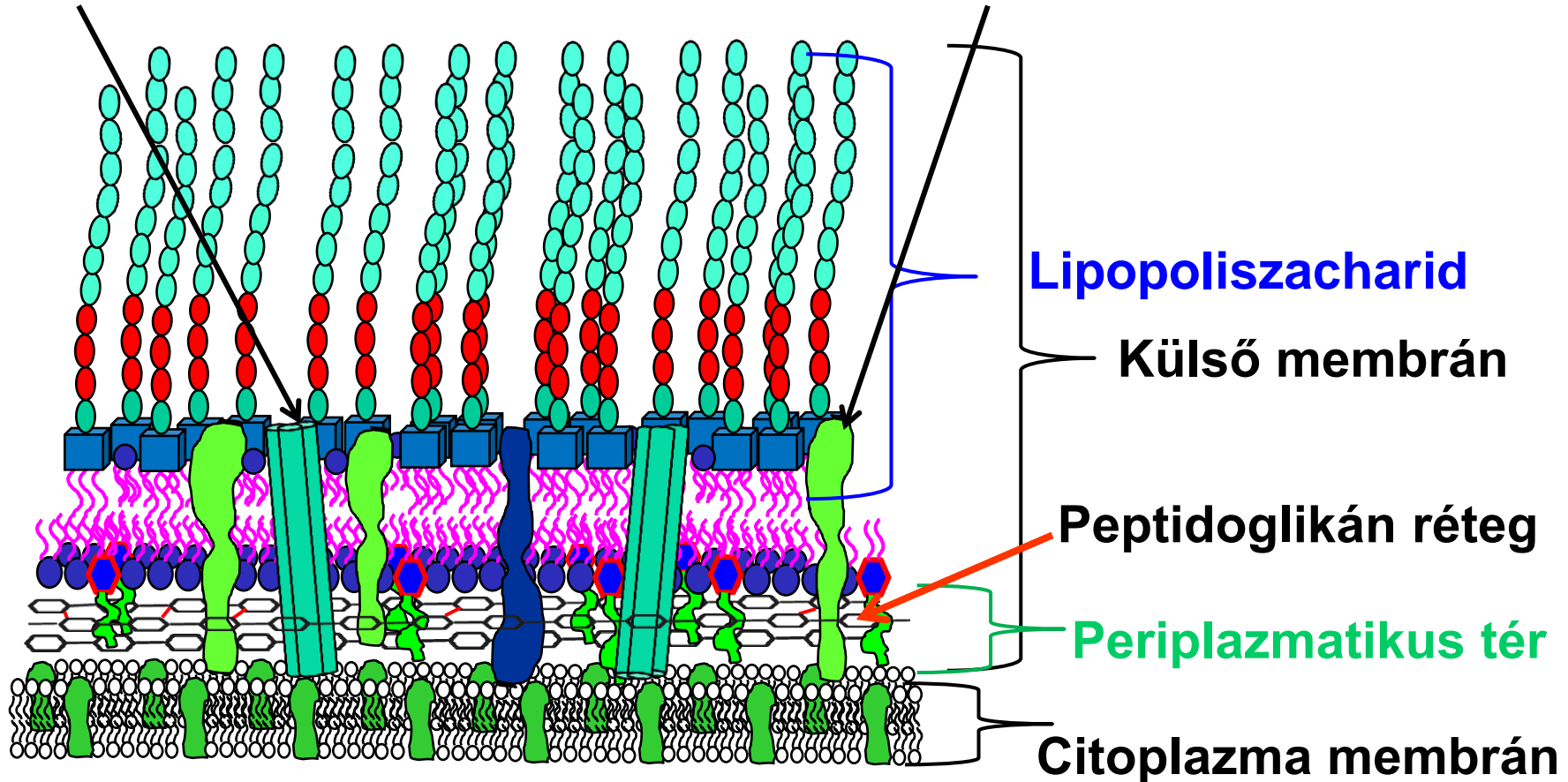
Gram (-)

piros lesz

Sejtfal Gram (-) sejtfal sematikus szerkezete

Porin

Membránkötött fehérje



Lipopoliszacharid

Külső membrán

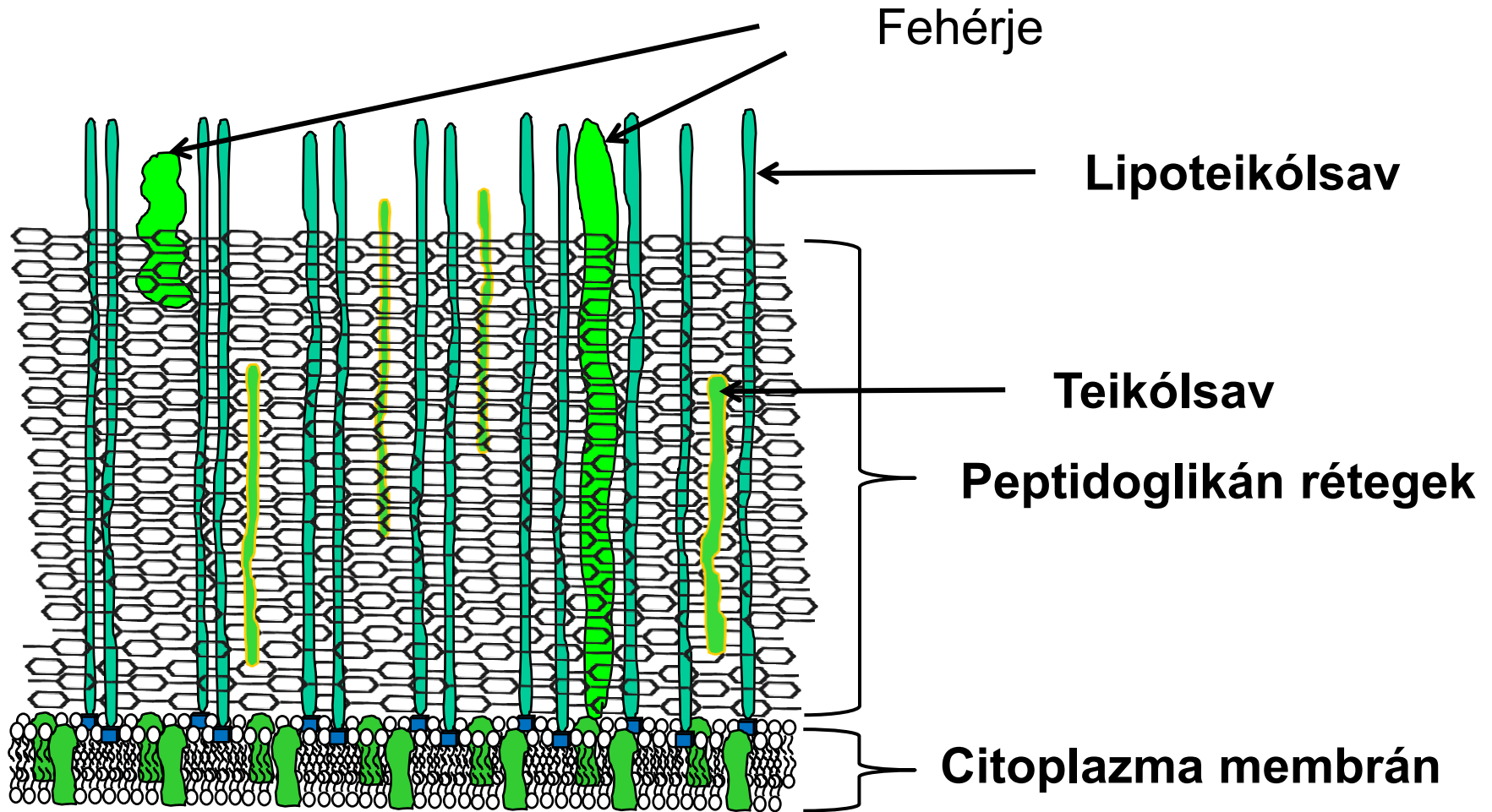
Peptidoglikán réteg

Periplazmatikus tér

Citoplazma membrán

60

Sejtfal Gram (+) sejtfal sematikus szerkezete



Differenciáló vagy összetett festés, Gram-szerinti festés.

A kenet készítés és a Gram-szerinti festés oldatai



62

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSOOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERUSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK

ERŐSÍTÉSÉRE

TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

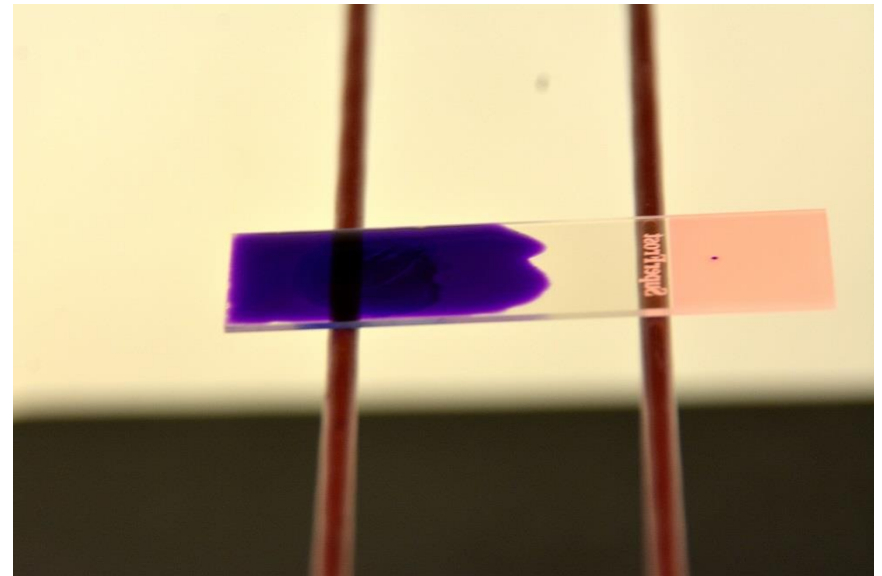
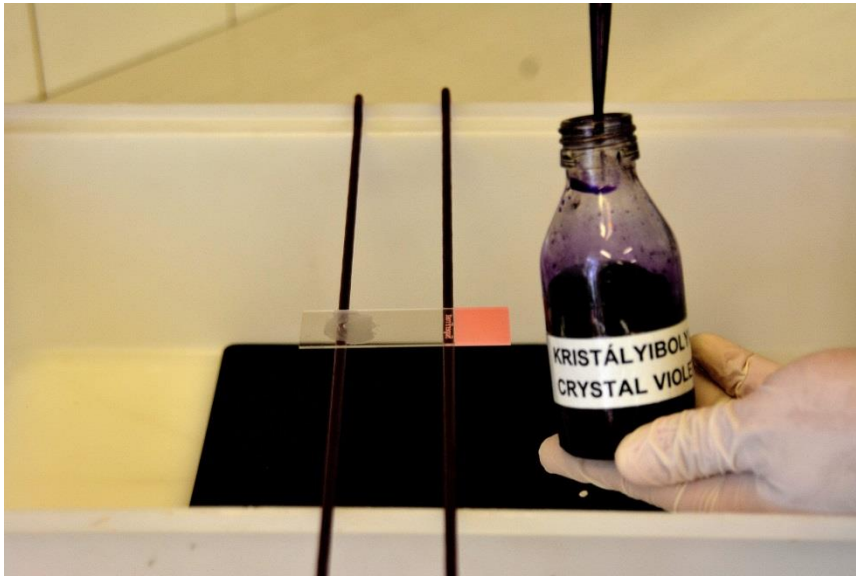
Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujsechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

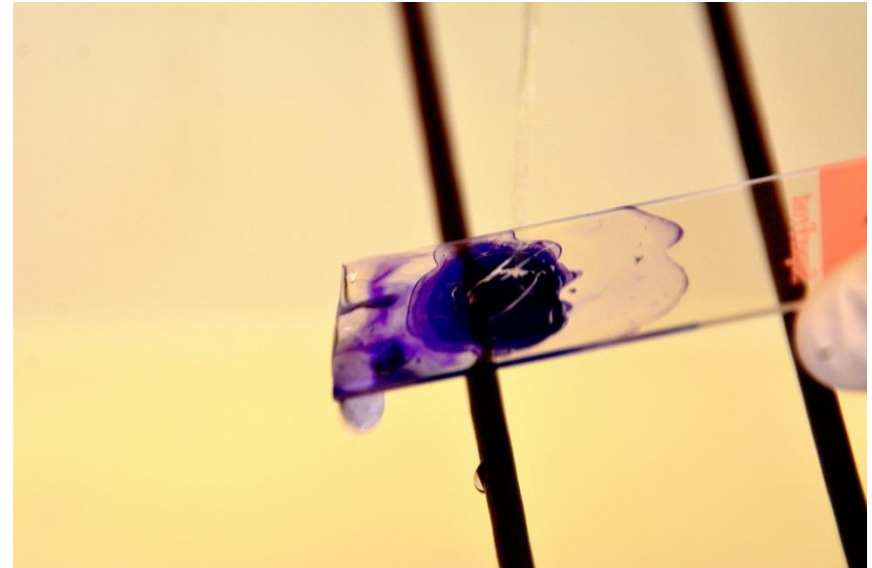
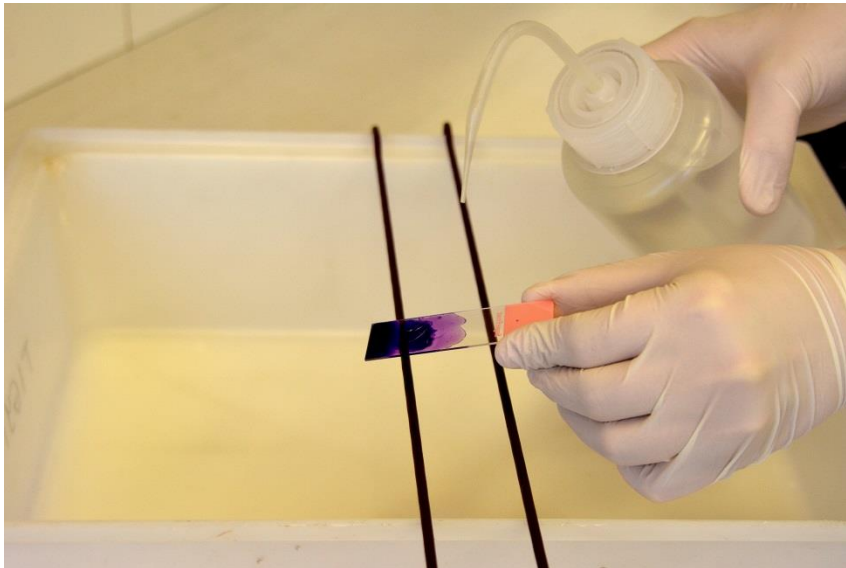
1. **ALAP FESTÉS**: A kenet készítésnél leírtak szerinti készítményt **Gentiana-ibolyával (kristályibolya)** fedjük .
1 perc



63

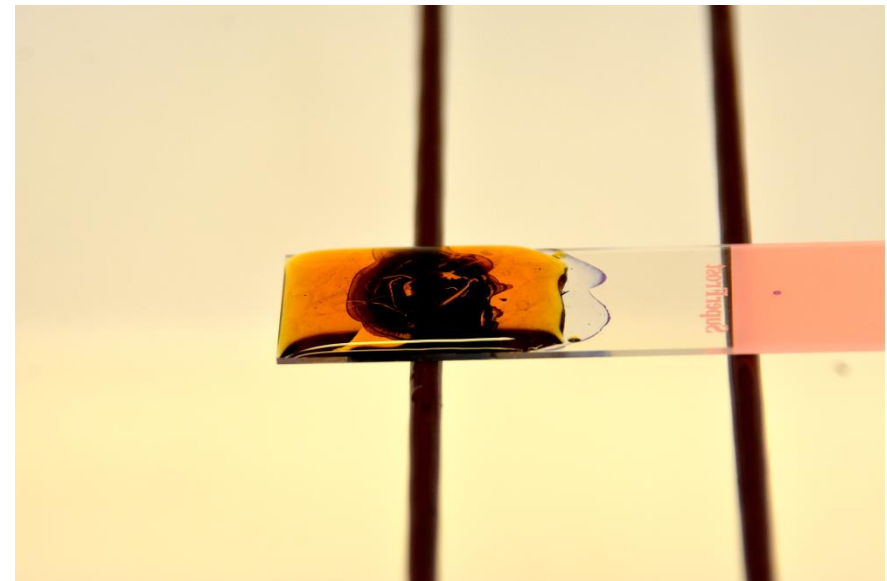
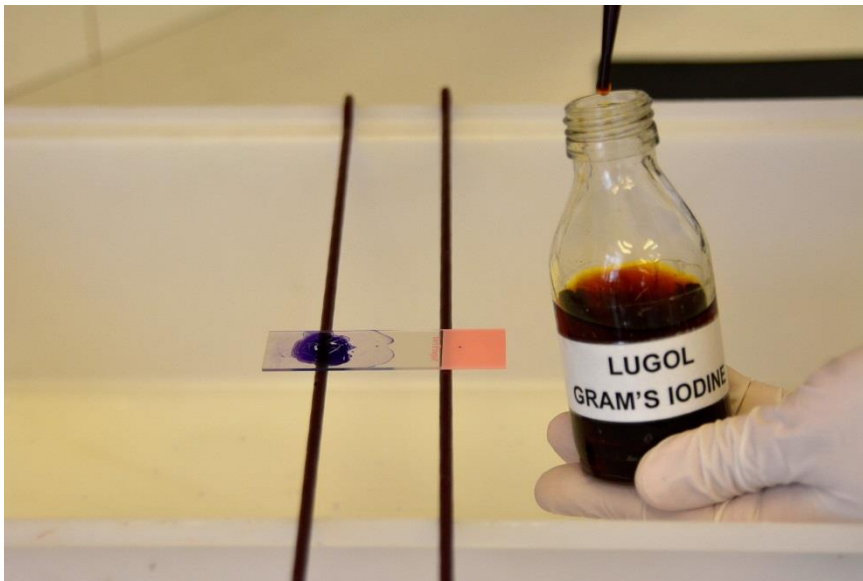
Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

2. ÖBLÍTÉS: vízzel.



Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

3. KOMPLEX KÉPZÉS : kenet felszínét lugol oldattal lefedjük. 2 perc.



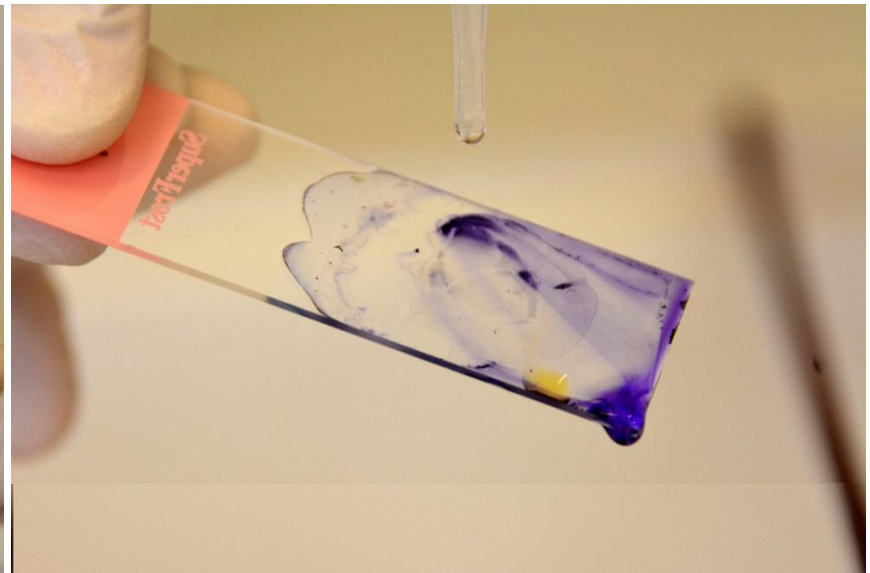
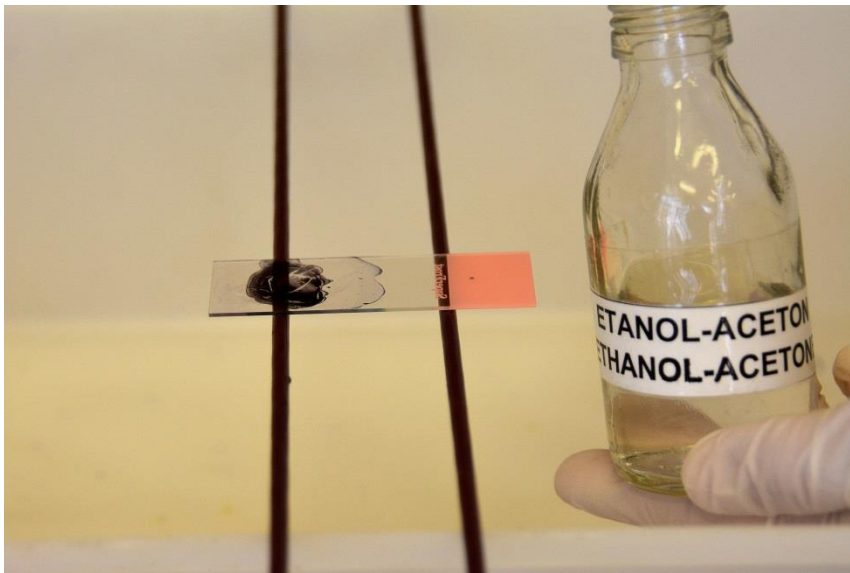
Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

4. ÖBLÍTÉS: vízzel.



Differenciáló vagy összetett festés, Gram- szerinti festés.

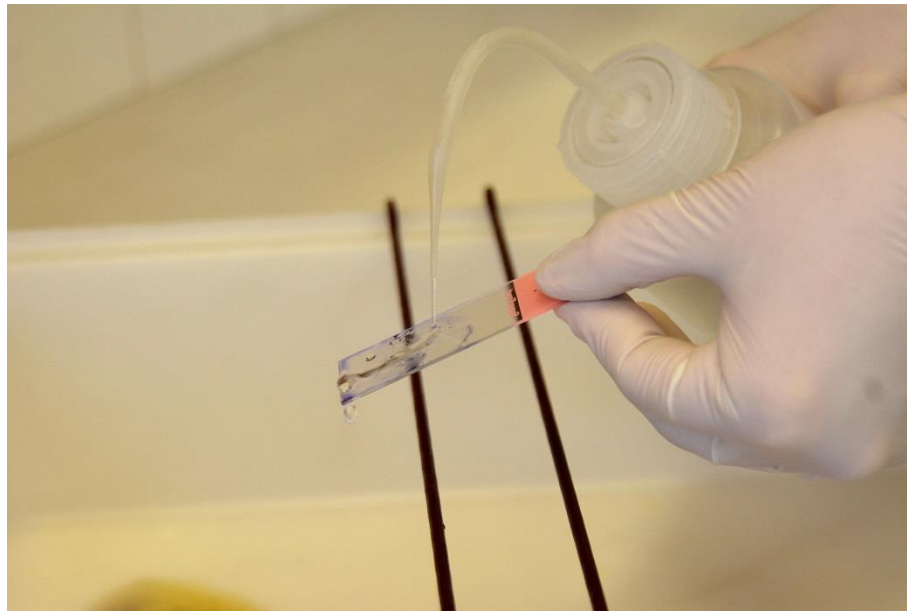
5. DIFFERENCIÁLÁS: A kenetet ferdén tartva acetonos alkohol oldatot csepegtetünk a festett baktériumokkal fedett területre addig, amíg a kristályibolya intenzíven oldódik ki. A TÚLDIFFERENCIÁLÁS HAMIS EREDMÉNYT OKOZ! 5-15 mp (10- 15 csepp)



67

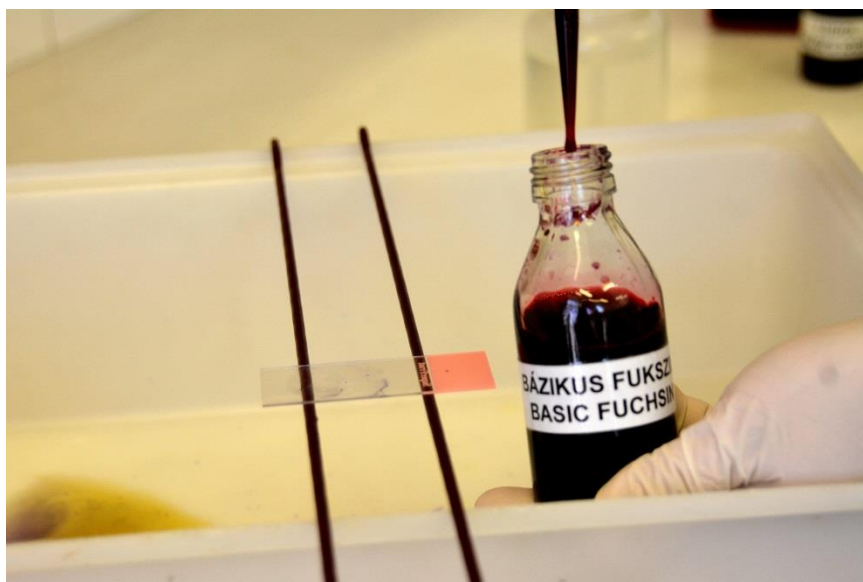
Differenciáló vagy összetett festés, **Gram-szerinti festés.**

6. ÖBLÍTÉS: vízzel.



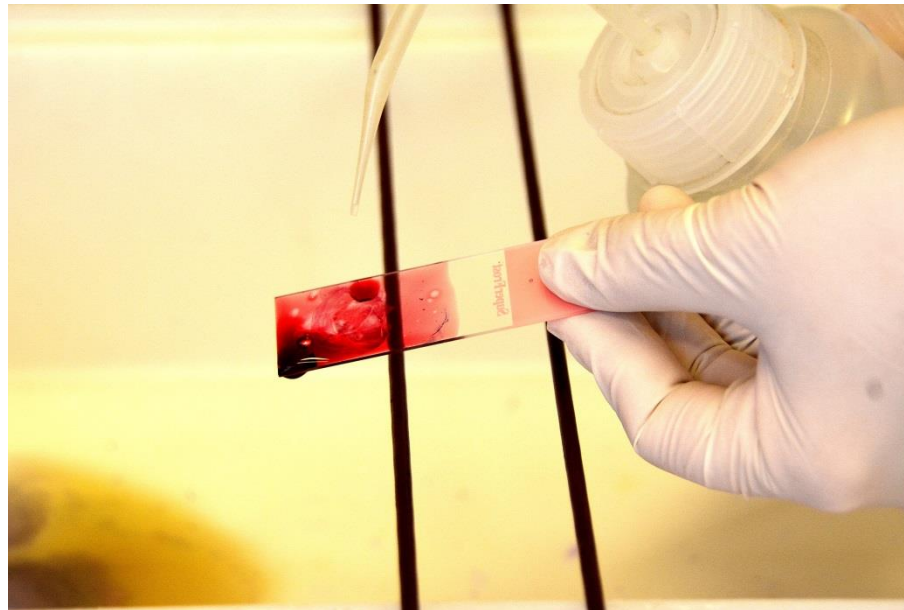
Differenciáló vagy összetett festés, **Gram-szerinti festés.**

7. UTÓFESTÉS: kenet felszínét vizes fukszin oldattal lefedjük.



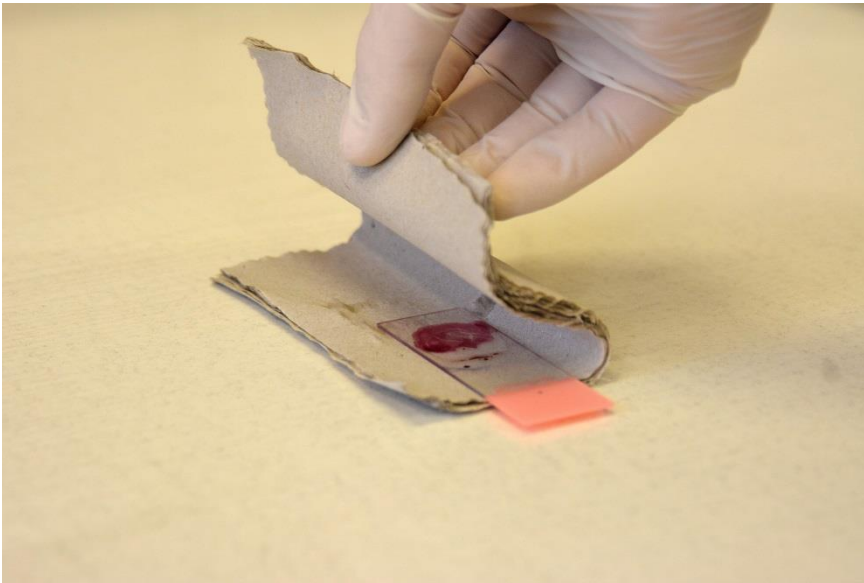
Differenciáló vagy összetett festés, **Gram-szerinti festés.**

8. ÖBLÍTÉS: vízzel.



Differenciáló vagy összetett festés,
Gram- szerinti festés.

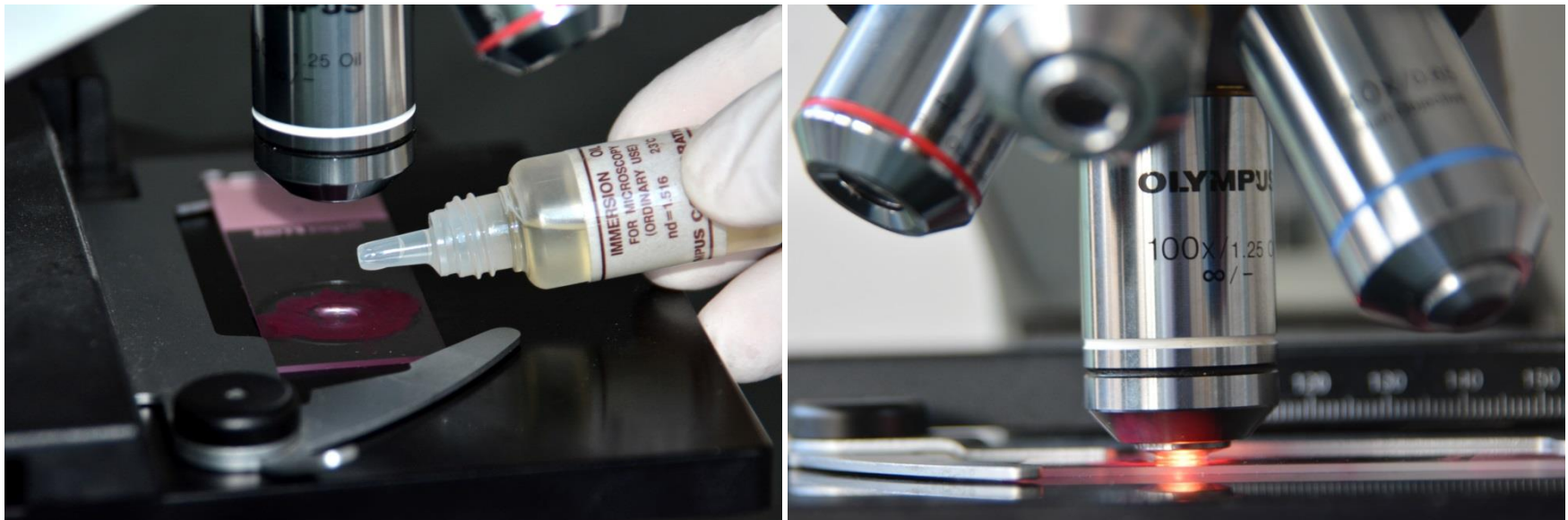
9. SZÁRÍTÁS: a víz leitatása papírtörölővel. **Törölni tilos !**



71

Differenciáló vagy összetett festés,
Gram-szerinti festés.

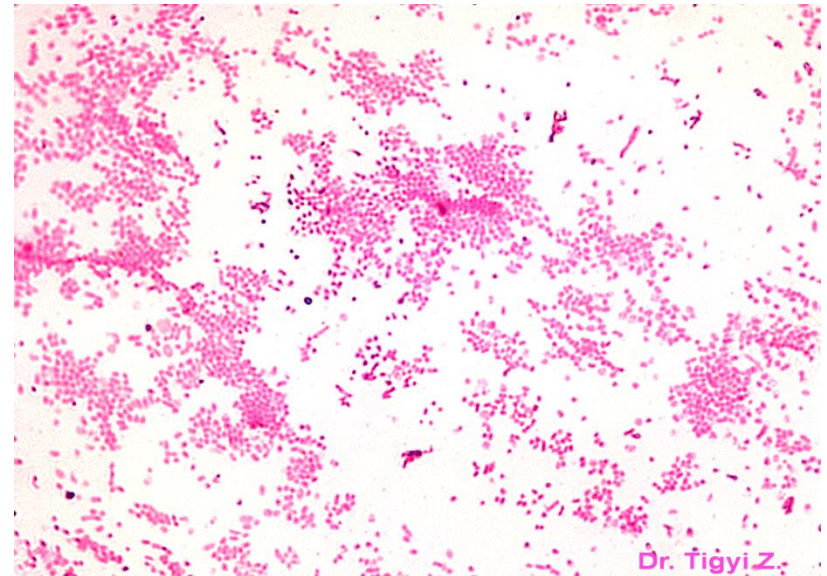
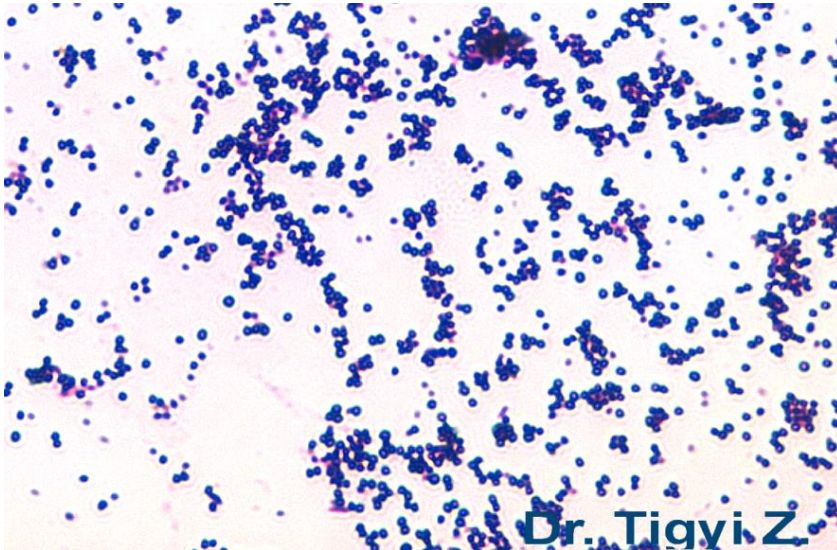
10. MIKROSKÓPIZÁLÁS: A kenetre 1 csepp immerziós olajat cseppenünk, majd 100x-os nagyítású immerziós objektívvel vizsgáljuk.



Gram-szerinti festés

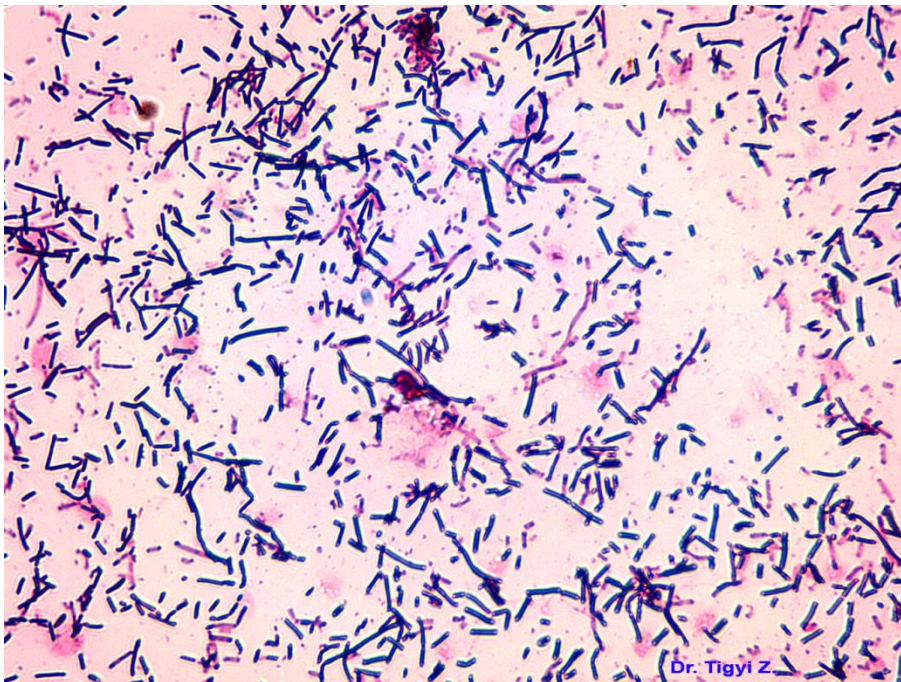
Staphylococcus aureus,
Gram (+) coccus

Haemophilus influenzae,
Gram (-) coccus



Gram-szerinti festés

Bacillus cereus,
Gram (+) pálca

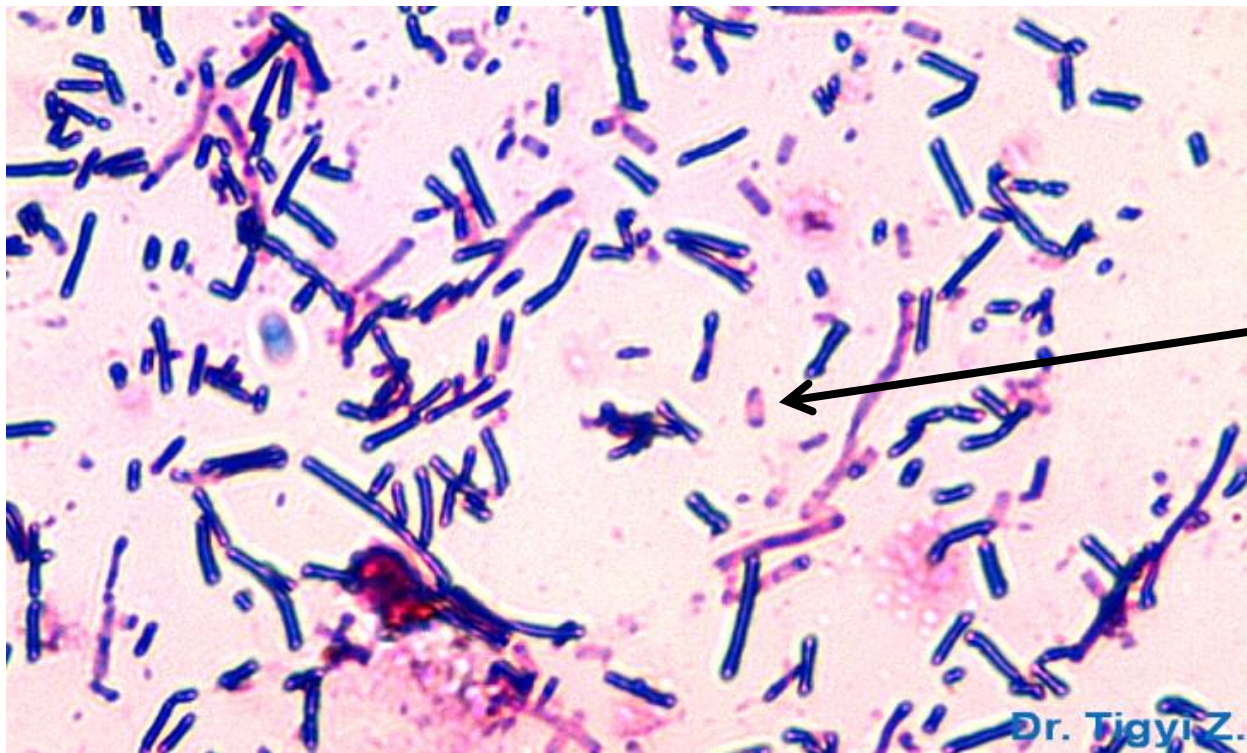


Escherichia coli,
Gram (-) pálca



Gram-szerinti festés

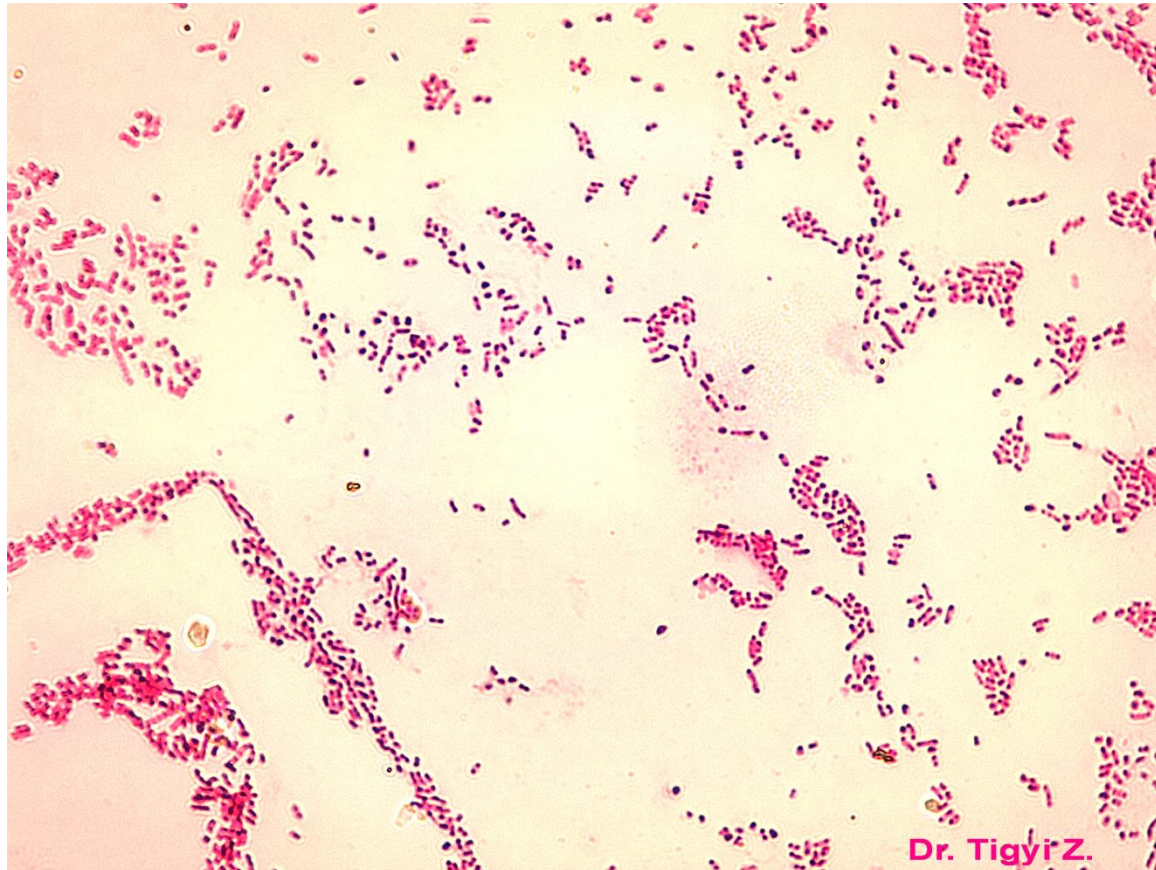
Bacillus cereus, Gram (+) pálcá 48 órás tenyészetből, a nem Gram (+)-van festődő sejtek az endospóra képzés végső fázisában vannak.



A nem festődő rész az endospóra

Gram-szerinti festés

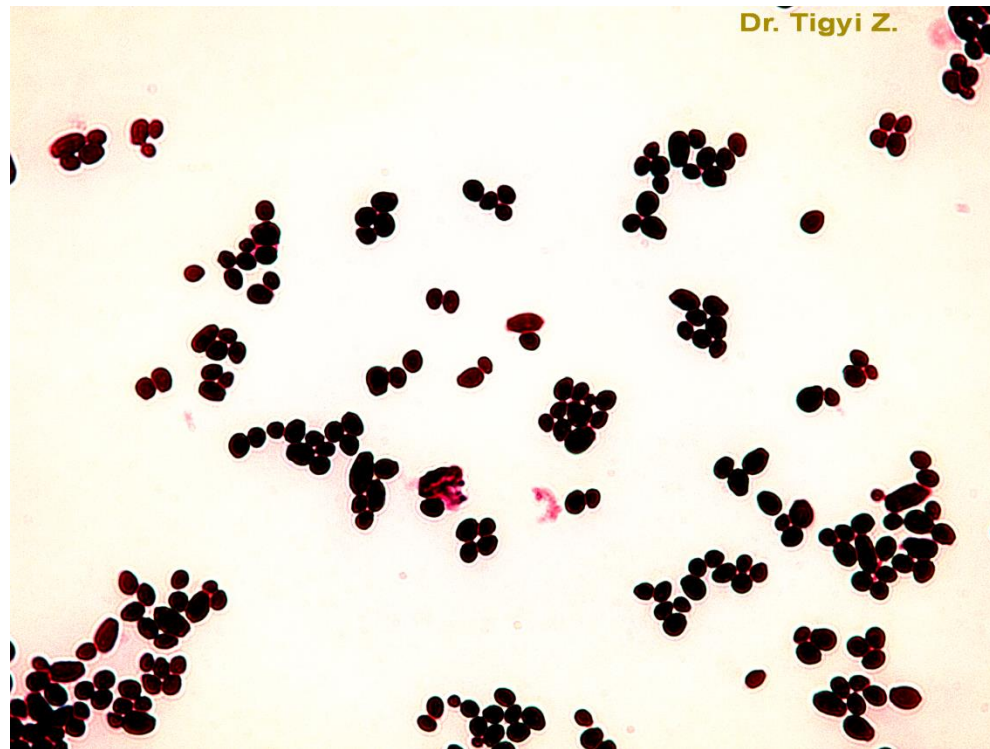
Klebsiella pneumoniae, Gram (-) pálcá



Gram-szerinti festés

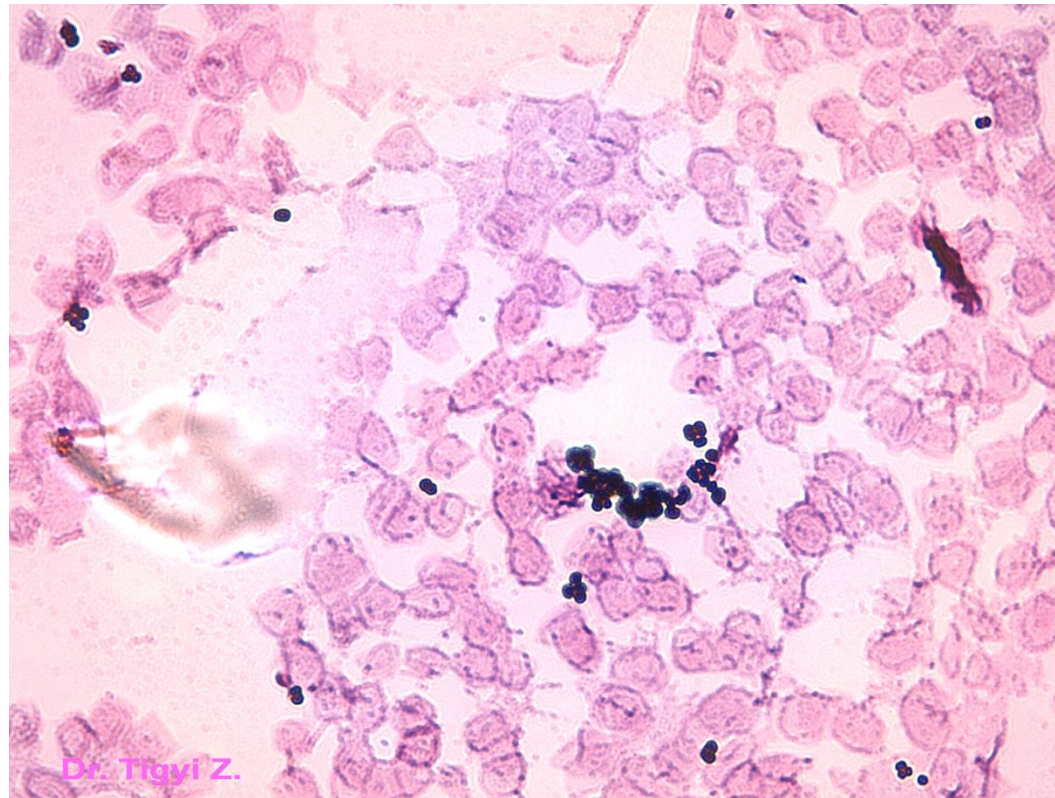
Candida albicans, sarjadzó gomba

Gram (+) festődésű, de eukariota sejt, amely sejtfala felveszi a kristályibolyát a szénhidrát tartalma miatt, annak ellenére, hogy, **nincs valódi Gram (+) bakteriális sejtfala.**



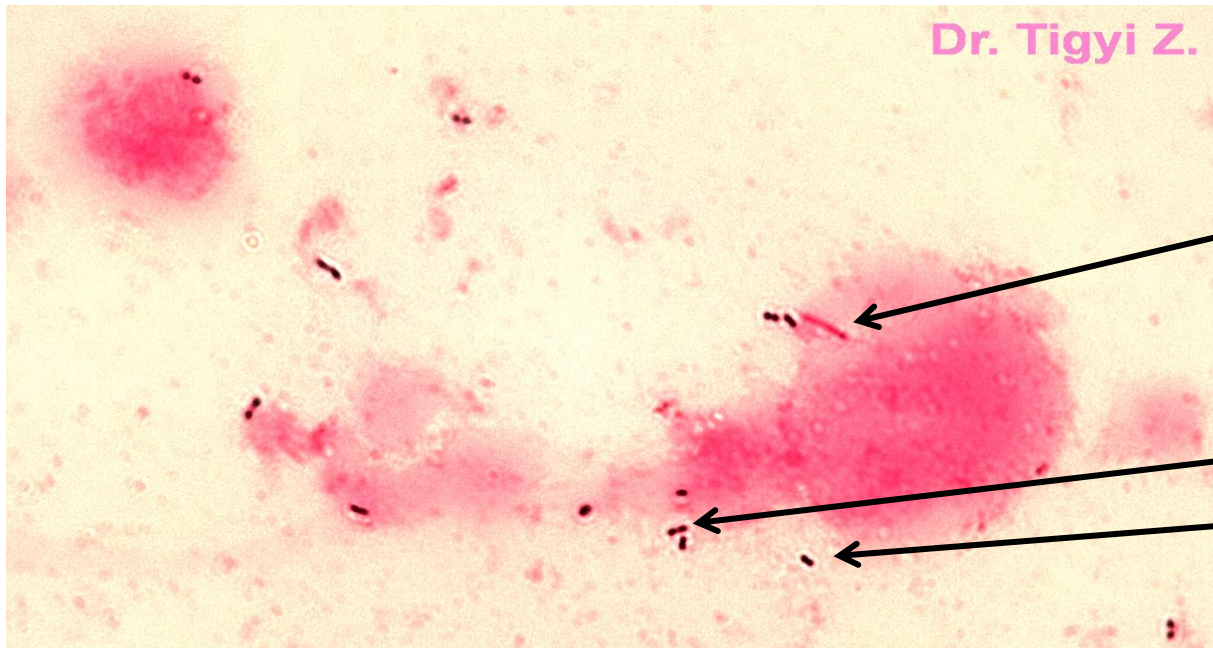
Gram-szerinti festés

Gram (+) *coccus*-ok hemokultúrából festve,
láthatóak a VVT-k között a coccusok.



Gram-szerinti festés

Hörgő váladék. Láthatóak a **Gram (-) pálcák**. A pálcák körüli **nem festődő sáv a tok jelenlétére utal**, amely nem festődik Gram szerint. *Klebsiella pneumoniae* tenyészet ki a mintából.

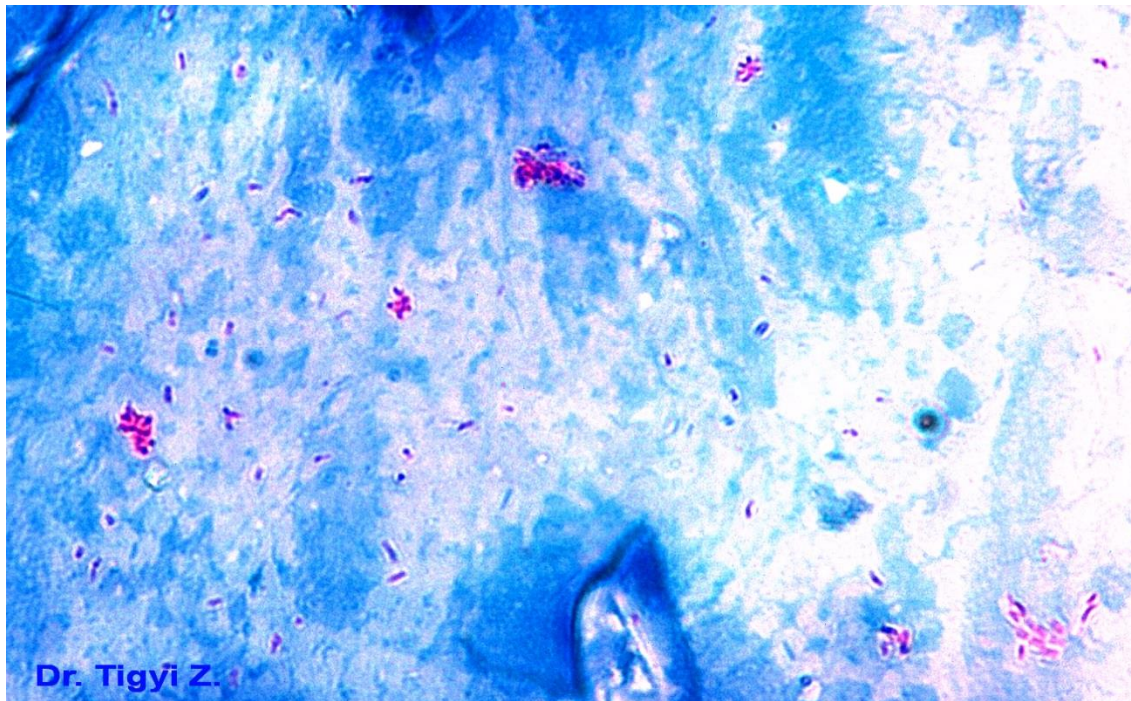


Alveoláris
macrophag
fagocytálja a
baktérium sejtet.

Nem festődő háttér
a baktérium körül,
a **tokra** utal.

Ziehl-Neelsen vagy saválló festés

Mycobacterium tuberculosis-t tartalmazó köpet,
 a festés **nem faj specifikus**, így tenyésztés nélkül csak
 „**saválló pálcá**” diagnózis adható ki.
 (A képen piros pálcák fészekbe tömörülve)



Neisser-szerinti festés

***Corynebacterium diphtheriae*, Neisser féle festéssel, amely a Babes-Ernst (polifoszfát) szemcséket metakromáziásan festi pirosas színűre, a mely a pálcák egyik végén vannak.
Nem faj specifikus festés.**



Köszönet nyilvánítás

Dr. Smuk Gábornak, (PTE. KK. Patológia Intézet), aki lehetővé tette, illetve segített, hogy a festett készítményekről jó minőségű fényképek, illetve a natív készítményről video felvételt készíthessek.

Horváth Mariannának, (PTE. KK. Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézet), Ph.D. hallgatónak, aki segédkezett a többi fotó elkészítésében.