



MIKROSKOPIE

Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2016
Mikrobiologický ústav LF MU

Osnova

- ▶ Organizační záležitosti
- ▶ Mikroskop
- ▶ Úvod do mikrobiologie
- ▶ Typy barvení



Mikroskopy

► Olympus CX-31 a Leica

Okulár

Objektiv

Mikroskopický stolek

Kondenzorová
(aperturní, irisová) clona

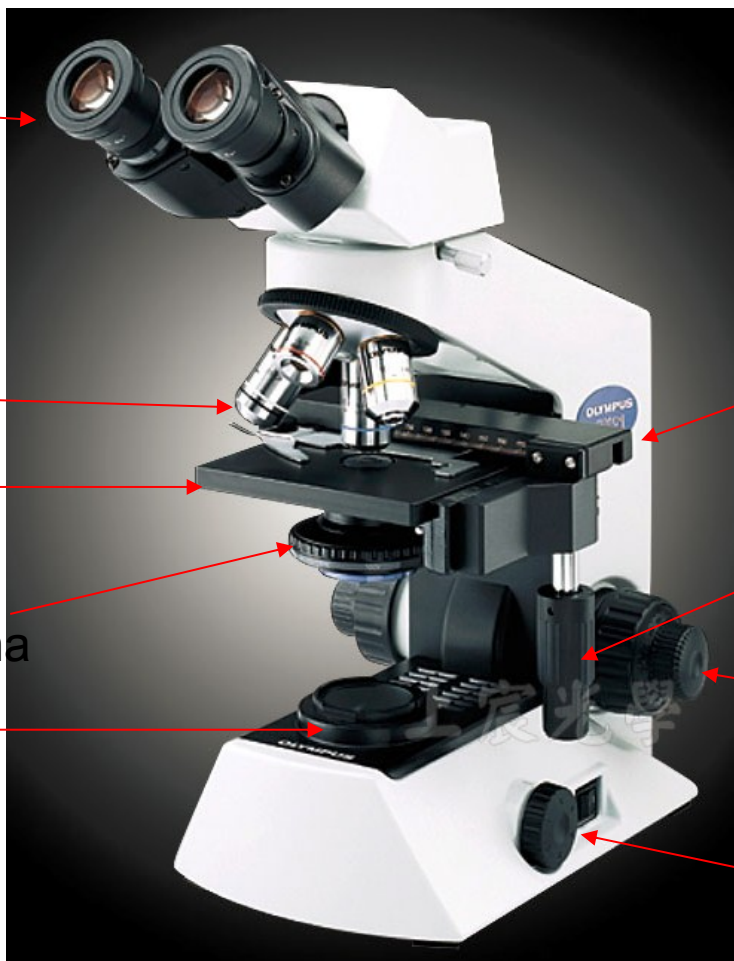
Kolektorová clona

Vypínač

Regulátor pozice

Makrošroub a
mikrošroub

Regulátor
světla



Mikroskopy

- ▶ **Regulátor světla:** většinou s ním netřeba manipulovat.
- ▶ **Kolektorová a kondenzorová clona:** čím větší zvětšení, tím více světla je třeba. K regulaci je možno použít obě clony.
- ▶ Doporučuje se nastavit hodnotu numerické apartury (NA) kondenzoru pomocí clony na 70 - 80 % NA použitého objektivu. Tímto nastavením omezíme rozptyl světla a dosáhneme lepšího rozlišení, kontrastu i hloubky ostrosti.
- ▶ **Makrošroub:** při jeho použití kontrolujte pohledem ze strany vzdálenost objektivu od preparátu. Nikdy nepoužívejte tehdy, když se díváte do mikroskopu!
- ▶ **Mikrošroub:** při používání kontrola ze strany. Pouze při posouvání nahoru je možno se dívat do okuláru.



Mikroskopy

- ▶ **Kondenzor:** nemanipulujte s ním.
- ▶ **Regulátor pozice:** slouží k „posunování se“ po preparátu.
- ▶ **Revolverový měnič objektivů:**
 - **Neimerzní objektivy:** 4x, 10x, 20, 40x – pro pozorování nativních preparátů. Nepoužívá se imerzní olej.
 - **Imerzní objektiv:** 100x – pro pozorování barvených preparátů (Gram, Giemsa, Trichrom). Nutno použít imerzní olej! Nutno očistit objektivy znečištěné imerzním olejem (za pomoci gázy a benzínu).



Preparáty

- ▶ **Vámi vyrobené:** vyhodit do příslušné nádoby.
- ▶ **Trvalé:** očistit od imerzního oleje a navrátit do Petriho misky. Čištění: pomocí filtračního papíru a benzínu, na spodní straně po celé ploše, na horní pouze tam, kde není viditelný preparát. Maximálně lze odsát přebytečný olej, ale **nečistit plochu s preparátem!**



Po skončení mikroskopování

- ▶ Očistit mikroskop.
- ▶ Očistit/vyhodit preparát.
- ▶ Vypnout mikroskop.
- ▶ Zakrýt mikroskop protiprachovým obalem.
- ▶ Otřít pracovní plochu dezinfekcí.



Základní pojmy

- ▶ **Klinická mikrobiologie:** zabývá se klinicky významnými mikroorganismy, především pak těmi s patogenním potenciálem (diagnostika, terapie).
 - ▶ **Mikroorganismus (MO):** živý, mikroskopický organismus (celý nebo některá jeho stádia, například tasemnice není mikroskopická, ale její vajíčka ano). Nebuněčné organismy: viry, (priony,), buněčné organismy: archae, bakterie, eukaryota (sinice, řasy, paraziti, houby – plísně a kvasinky).
-



Základní pojmy

- ▶ **Kmen:** čistá kultura jednoho druhu mikroorganismu. Získáme jej kultivací (vypěstováním) na pevné půdě.
- ▶ **Vzorek:** tuhý či tekutý (moč, krev, sputum, stolice) či stěr/výtěr na vatovém tamponu, „to, co je odebráno pacientovi“.



Morfologie klinicky významných MO

- ▶ **Skladba viru:** nukleová kyselina (DNA nebo RNA, a to buďto ve formě ss nebo ds), protein, někdy obal. Různé typy symetrie – nejčastěji kubická a šroubovicová.
- ▶ **Kvasinky:** eukaryotní organismy, výskyt ve formě blastokonidií (kulatá, tlustostěnná buňka) nebo ve formě hyf/pseudohyf (vláknité, dlouhé buňky).
- ▶ **Paraziti:** eukaryotní organismy, velmi rozličná morfologie a vývojová stádia.



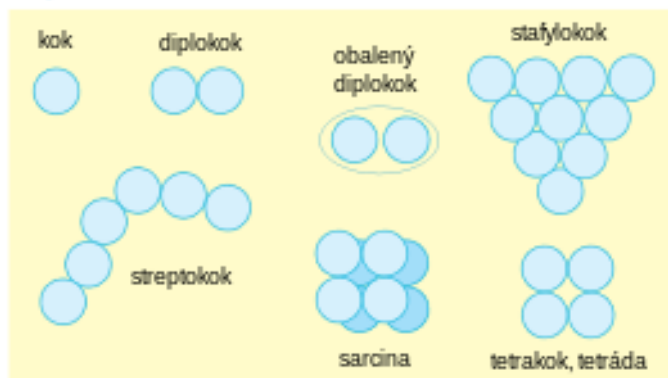
Morfologie bakterií

- ▶ **Koky** – kulaté buňky, mohou tvořit dvojice, řetízky (typicky např. streptokoky), shluky (např. stafylokoky) a trojrozměrné útvary (sarciny).
- ▶ **Tyčinky** – rovné (*Escherichia coli*) či zahnuté (vibria), mohou řetízkovat, vzácně spojeny delší stranou (palisádové uspořádání).
- ▶ **Vláknitý tvar** – zakřivený, „vlnitý“ tvar, spirochety, spirily.
- ▶ **Kokotyčinky**
- ▶ **„Beztvaré“** – bakterie bez buněčné stěny (např. mykoplasmata).

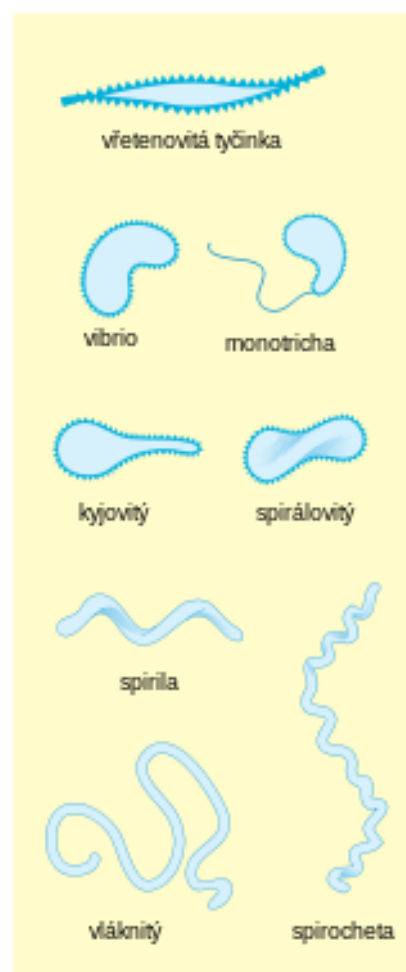


Morfologie bakterií

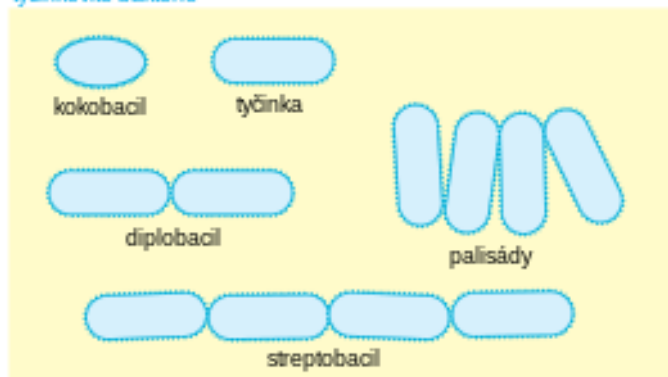
koky



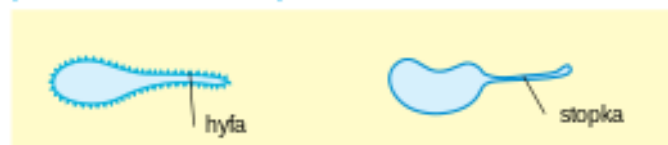
jiné



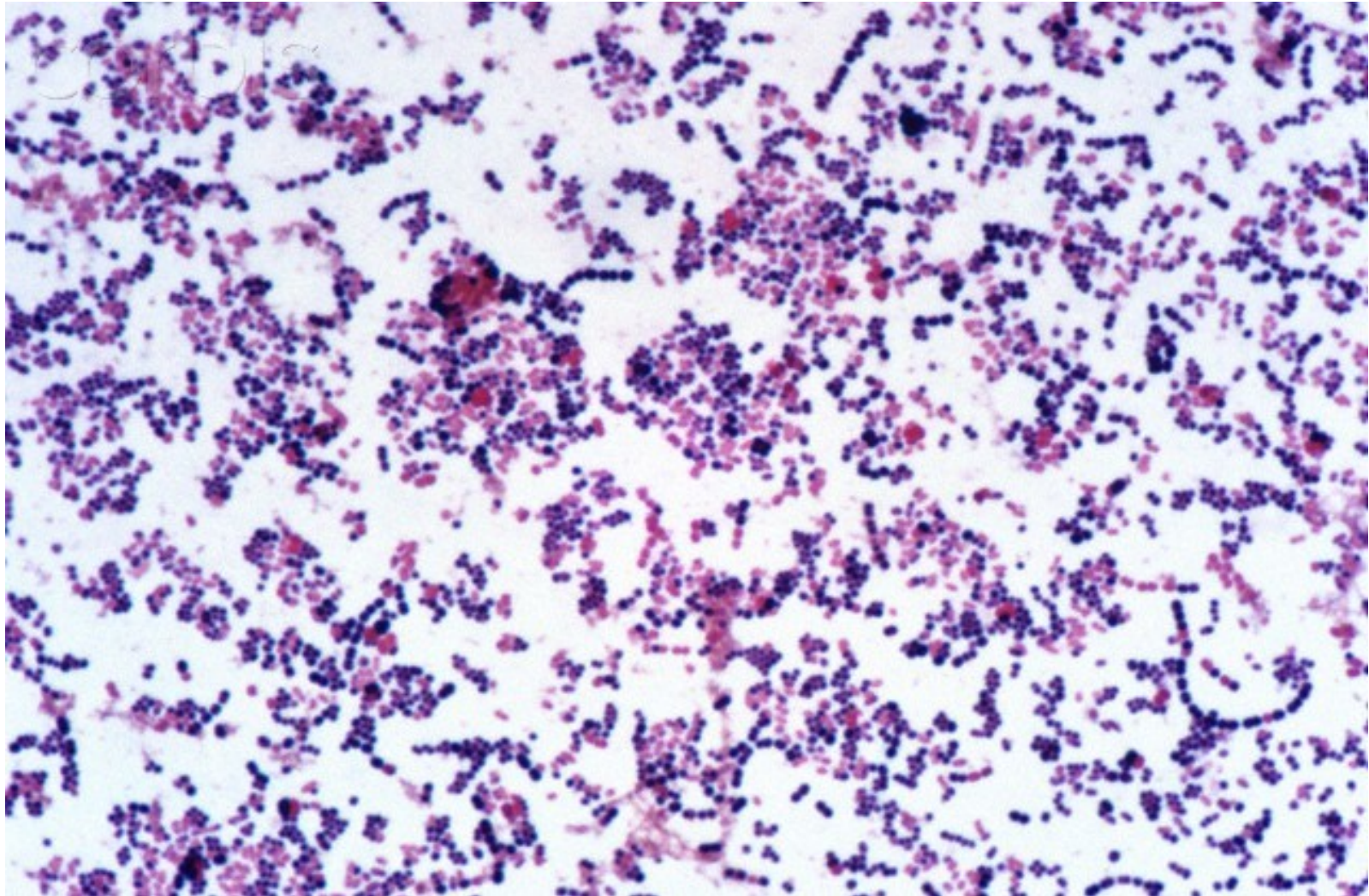
tyčinkovité bakterie



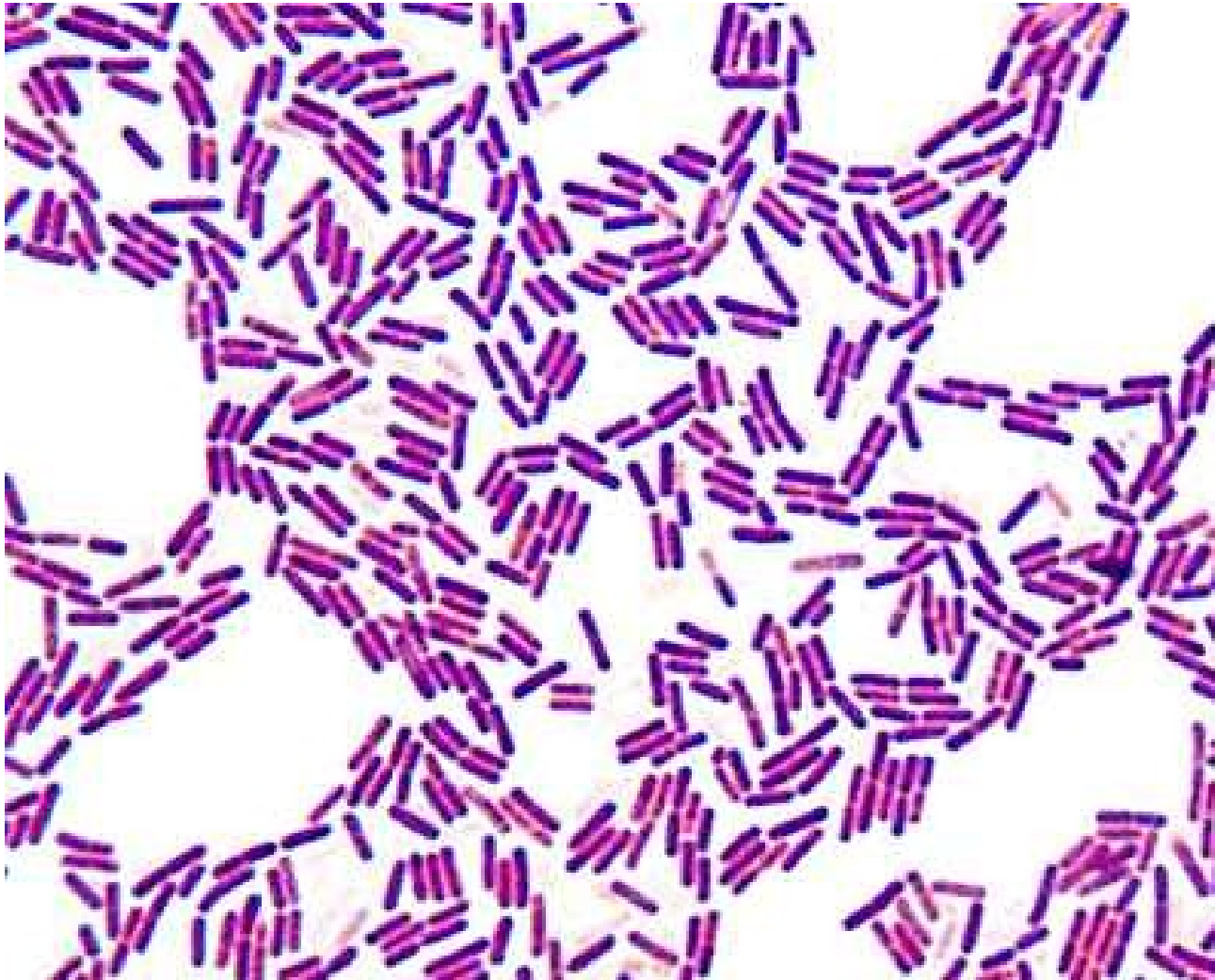
pučící bakterie a bakterie s přívěskem



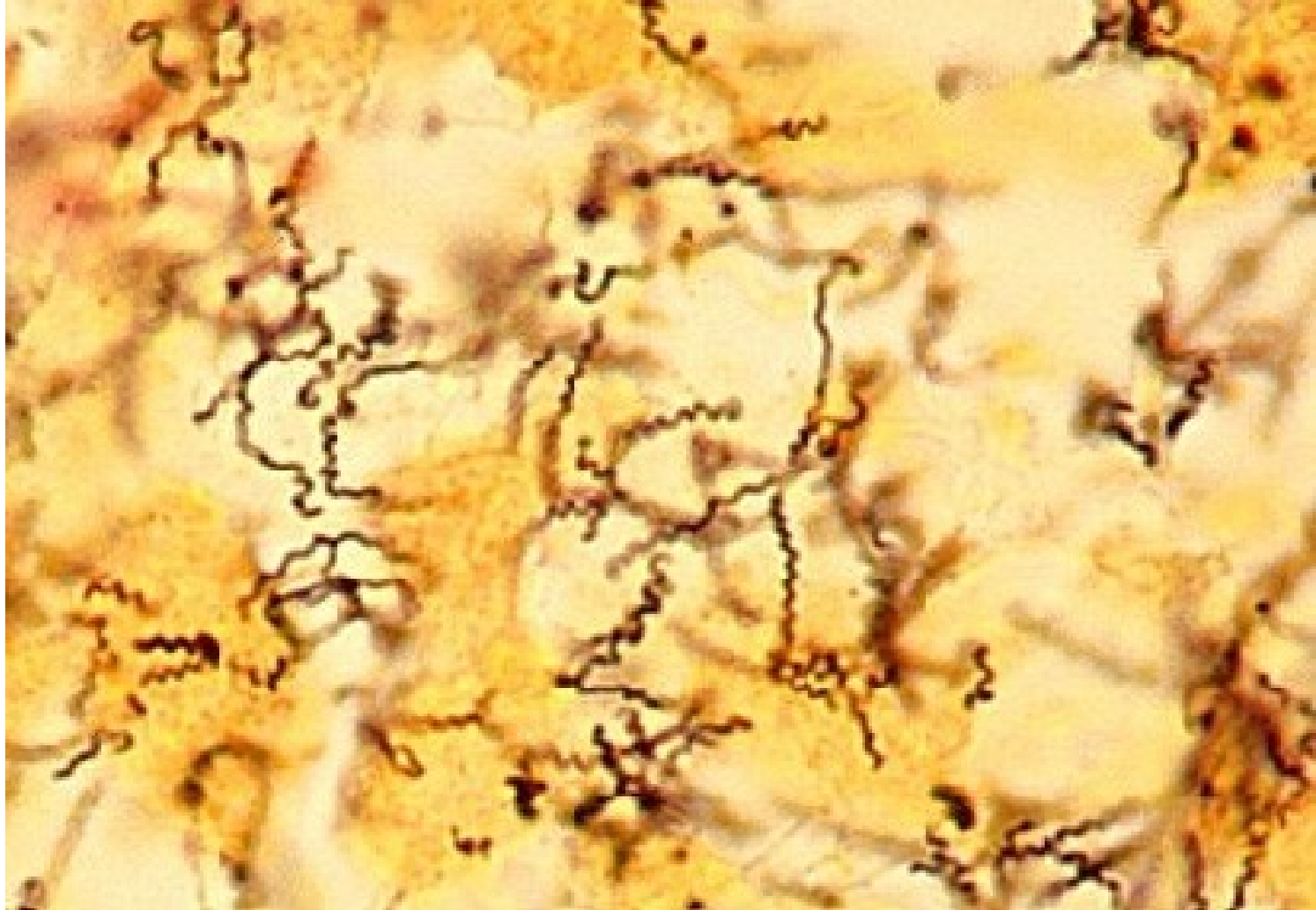
Morfologie bakterií – koky



Morfologie bakterií – tyčinky



Morfologie bakterii – spirochety

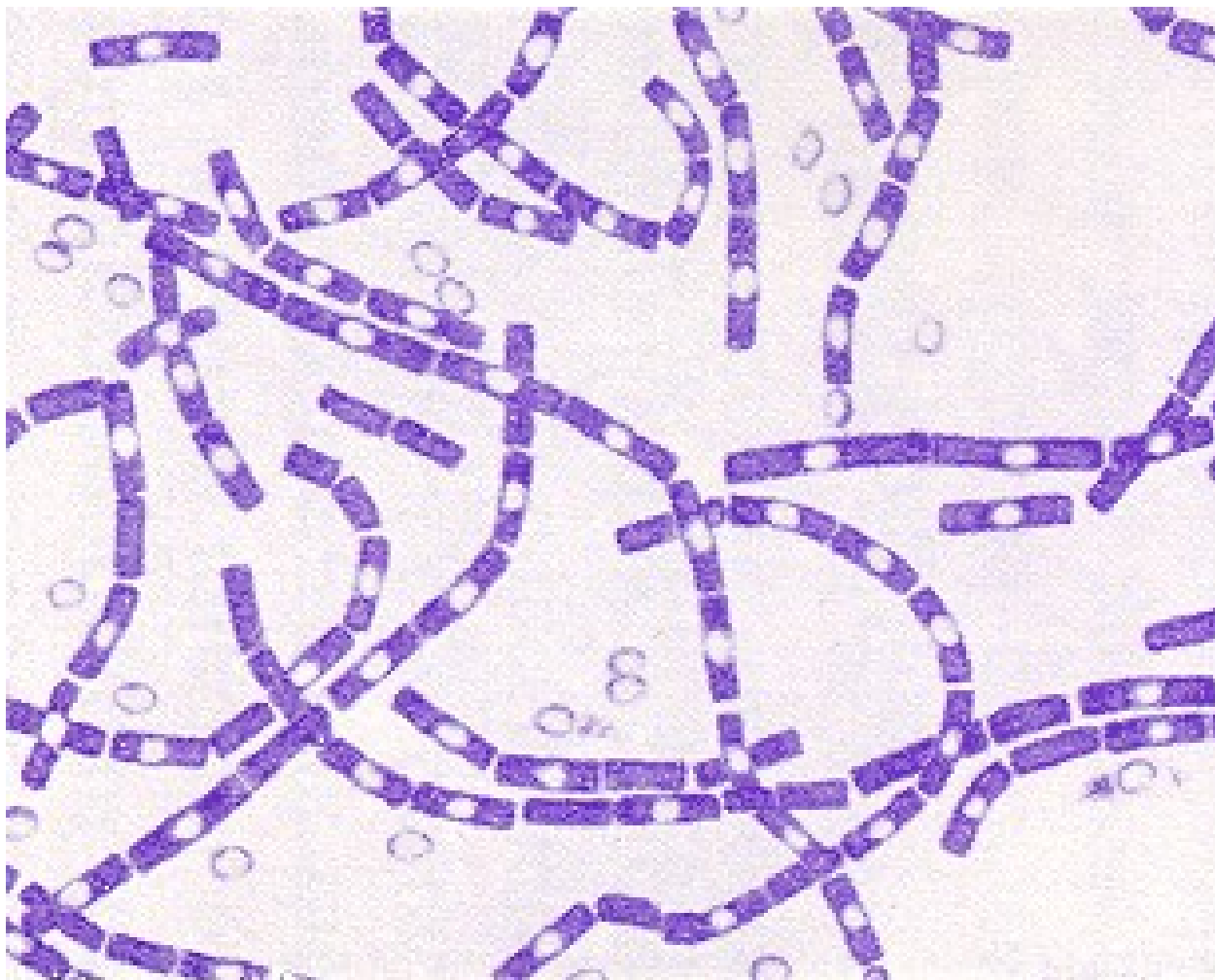


Morfologie bakterií

- ▶ **Pouzdro** – obklopuje bakterie, chrání je. Na zvýraznění pouzder se většinou používá negativní barvení, tedy pouzdro je viditelné jako světlé místo na tmavém pozadí.
- ▶ **Spory** – proces sporulace (buňka je rozdělena, z jedné části endospora která je včleněna do části druhé). Endospory mohou přežít velice extrémní podmínky (vysoké teploty, vysychání, dezinfekce). Endospory se při Gramově barvení neobarví – vidíme je jako „prázdná“ místa uvnitř buněk.



Morfologie bakterii – spory



Diagnostika mikroorganismů

- ▶ **Přímá** – hledáme přímo mikroba, jeho část nebo jeho produkt (např. toxin). Přítomnost lze dokázat buďto přímo ve vzorku nebo vypěstováním kmene. (identifikace)
- ▶ **Nepřímá** – hledání protilátky (většinou, ale lze také prokazovat antigeny) tvořené makroorganismem v reakci na činnost mikroorganismu.



Mikroskopie – typy

- ▶ **Elektronová** – nepoužívá se při běžné klinické diagnostice, použití nejčastěji ve výzkumu virů.
- ▶ **Optická**
 - ❑ **Nativní preparát** – na velké mikroorganismy, na pohyblivé mikroorganismy. **Nativní preparát v zástinu** – na spirochety.
 - ❑ **Barvené preparáty:**
 - **Dle Grama** – nejběžnější a nejdůležitější bakteriologické.
 - **Dle Ziehl-Neelsena** - např. *Mycobacterium tuberculosis*
 - **Dle Giemsy** – např. prvoci
 - **Gomoriho trichrom** – někteří prvoci
 - **Fluorescenční barvení** – emise světla různé vlnové délky
 - **Alciánová modř** – k obarvení mukopolysacharidů



Mikroskopie – typy

	Sušení a fixace	Krycí sklíčko	Imerze	Zvětšení
Nativní preparát	NE	ANO	NE	4x, 10x, 20x, 40x
Nativní preparát v zástinu	NE	ANO	ANO	4x, 10x, 20x, 40x
Barvené preparáty	ANO	NE	ANO	100x



Mikroskopie – příprava preparátu

► **Kmen:**

- ❑ Na podložní sklo kapka fyziologického roztoku.
- ❑ V kapce rozmíchat nabranou hmotu bakterií pomocí vyžíhané bakteriologické kličky.

► **Vzorek:**

- ❑ Tekutý: kápnout na podložní sklo.
- ❑ Nátěr na špejli: rozmíchat ve fyziologickém roztoku nebo přímo natřít na slíčko.



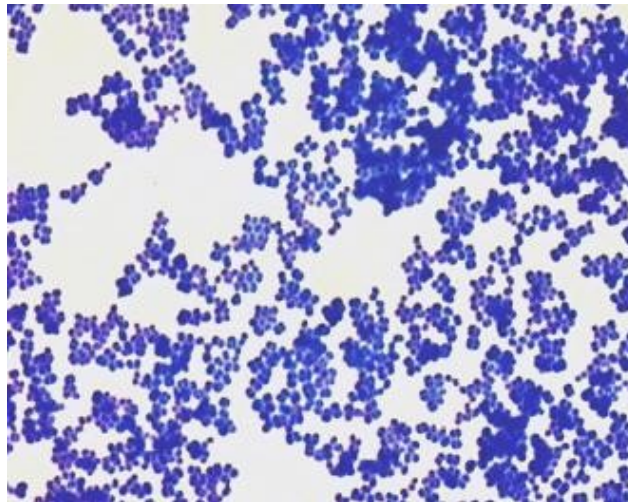
Mikroskopie – nativní preparát

- ▶ Vzorek nanese na podložní sklíčko do kapky fyziologického roztoku nebo přímo kapku vzorku.
- ▶ Nesušíme!
- ▶ Přikryjeme krycím sklem.
- ▶ Pozorujeme objektivy, kde není nutná imerze.



Mikroskopie – barvený preparát

- ▶ **Jednoduché barvení methylenovou modří –** nepříliš často používané. Fixovaný preparát se překryje vrstvou methylenové modři a nechá přibližně dvě minuty působit. Poté se barvivo spláchne vodou a sklíčko se zlehka osuší filtračním papírem. Preparát se pozoruje pod imerzí.



Mikroskopie – barvený preparát

► **Gramovo barvení:**

- ❑ Lze jím barvit bakterie, které mají buněčnou stěnu (nelze např. mykoplasmata, mykobakterie – jsou acidorezistentní a barvivo v jejich stěně neulpívá, spirochety – stěna je příliš tenká).
- ❑ **Kvasinky** – barveny většinou stejně jako G+, tedy fialově.
- ❑ **Lidské buňky** - většinou se barví do červena, jejich jádra do tmavě červené až fialové.



Mikroskopie – barvený preparát

► **Gramovo barvení:**

- ❑ **Princip:** odlišná stavba buněčné stěny G⁺ (silná vrstva peptidoglykanu, odolná mechanickému poškození, pevněji se na ni váže krystalová violet' či genciánová violet' – neodbarví se alkoholem) a G⁻ (tenká vrstva peptidoglykanu, chemicky odolná, složitější stavba, odbarví se alkoholem a dobarví safraninem).



Mikroskopie – barvený preparát

► **Gramovo barvení:**

□ **Postup:**

- Na podložní sklo nanést kapku fyziologického roztoku.
- Vyžíhanou mikrobiologickou kličkou nanést mikrobiální hmotu.
- Nechat usušit a zafixovat v protažení v plameni kahanu.
- V dřezu určením na barvení provést samotné Gramovo barvení.



Mikroskopie – barvený preparát

► **Gramovo barvení:**

□ **Postup samotného barvení:**

- Krystalová violet: 30 s
- (Opláchnout vodou)
- Lugolův roztok: 15 s
- (Opláchnout vodou)
- Alkohol: 15 s
- Opláchnout vodou!!!
- Safranin: 60 s
- Opláchnout vodou
- Nechat usušit a mikroskopovat pod imerzí

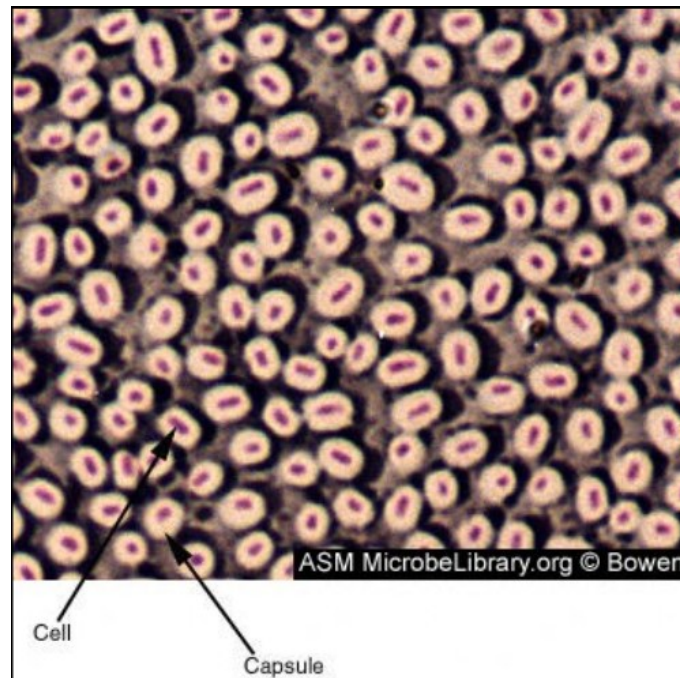


Mikroskopie – barvený preparát

► Barvení dle Burriho:

□ Používá se k barvení pouzder

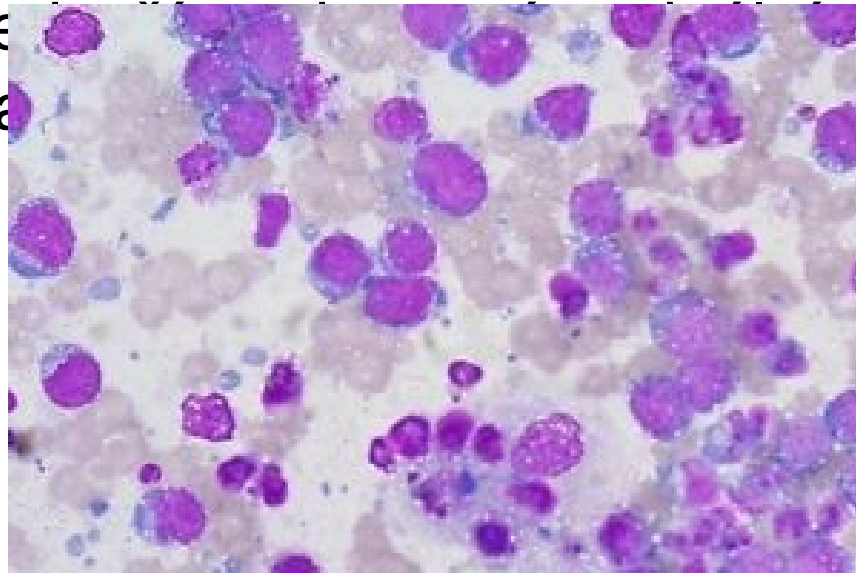
- Bakterie barveny červeně a pouzdra dobarvena tuší – pouzdro viditelné jako naobarvená část.



Mikroskopie – barvený preparát

► **Giemsovo barvení:**

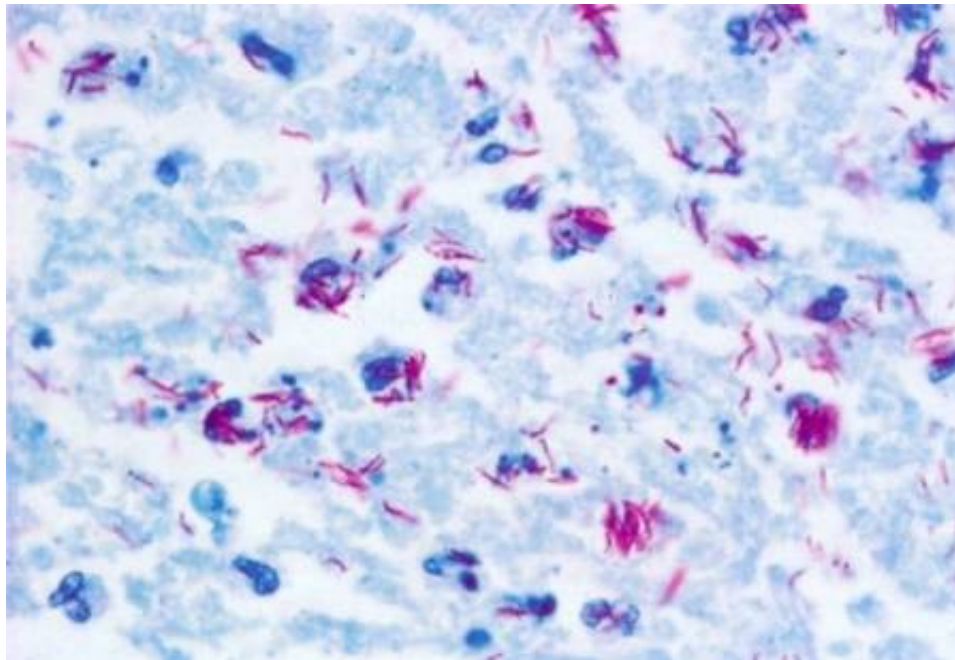
- ❑ Preparát se nefixuje plamenem, ale pomocí metyalkoholu.
- ❑ Barvení modrým barvivem dle Giemsy-Romanowského.
- ❑ Použití především pro detekci maligních sekretů a při



Mikroskopie – barvený preparát

► Barvení dle Ziehl-Nielsen:

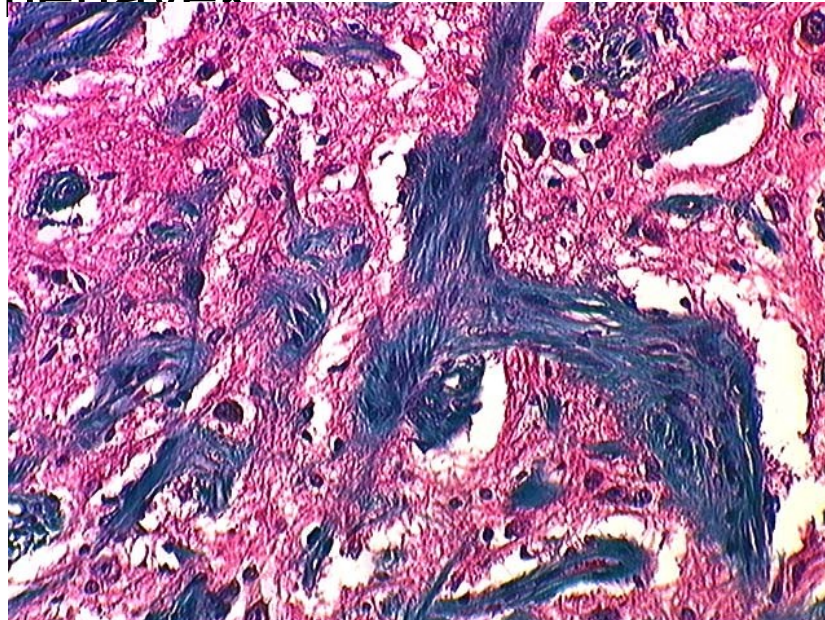
- ❑ U acidorezistentních bakterií – bakterií s hydrofobní buněčnou stěnou, především u mykobakterií, nokardií a aktinomycet.



Mikroskopie – barvený preparát

► Barvení Gomoriho trichromem:

- ❑ Pro barvení střevních prvoků (giardie, entaméby). Složité, mnohakrokové.
- ❑ K rozlišení patogenních a nepatogenních druhů střevních měňavek



Po tomto cvičení byste měli:

- ▶ Znat pravidla pohybu a práce v laboratoři
- ▶ Umět popsat mikroskop a používat jej
- ▶ Vyjmenovat základní mikroskopické organismy
- ▶ Znat základní mikrobiologická barvení

