

Pátráme po mikrobech
Díl II.

Mikroskopická diagnostika II

Gramovo barvení + pouzdra

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už víme

- Mikroby mají různou **velikost**. Kvasinky jsou větší než bakterie, ty zase než viry
- Bakterie mají různý **tvar** (koky, kokobacily, tyčinky různých tvarů, spirochety)
- Bakterie mají různé **uspořádání** (shluky, řetízky, dvojice); kokům v řetízcích raději obecně neříkáme „streptokoky“, protože by to mohly být třeba enterokoky.
- Některé bakterie tvoří **spory**, jež se nebarví.

Porovnání velikosti: kvasinka rodu *Candida* a bakterie rodu *Staphylococcus*

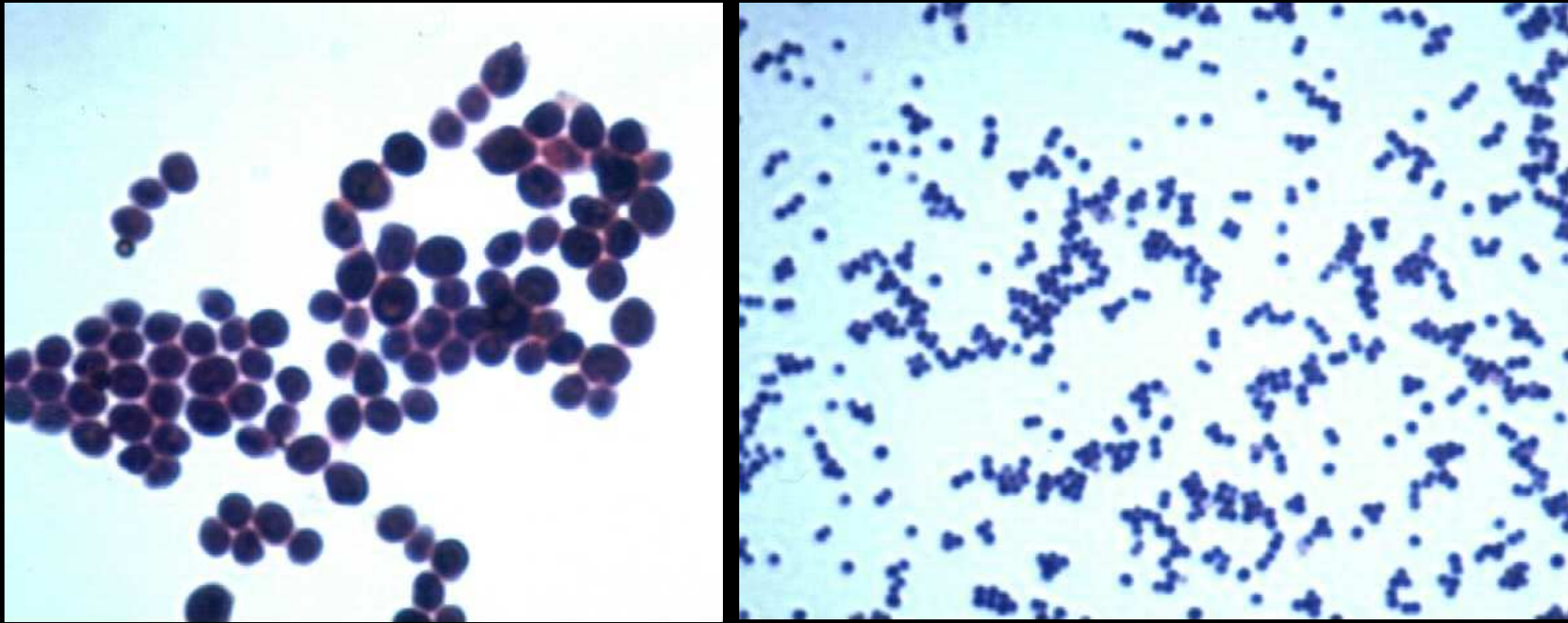


Foto: archiv ústavu, převzato z www.medmicro.info

Pohádka (teda, ono to má i reálný základ 😊)

- Byl jednou jeden Dán, a ten se jmenoval **Christian Gram**. Barvil si bakterie a byl našťvaný. Občas nabarvil vzorek od pacienta, jenže kromě bakterií si obarvil i epitelie, a to se mu nelíbilo. „Hnusné epitelie, zakrývají mi bakterie!“, nadával.
- A tak začal bádat. Hledal nějaký postup, při kterém by bakterie zůstaly nabarvené, ale epitelie by barevné nebyly...

Pokračuje na další obrazovce

Pohádka pokračuje

- Přišel na to, že když vzorek obarví krystalovou nebo genciánovou violetí, a pak vazbu barviva na buněčnou stěnu posílí Lugolovým roztokem, neodbarví se bakterie ani alkoholem. Zato epitelie se odbarví. „Hurá“, zakřičel, když to zjistil.
- Jenže záhy zjistil, že s epiteliemi se mu odbarví i část bakterií. „Do pr...kýnka“, zabručel, vypil zbytek alkoholu, co měl na odbarvování, a svou práci mrštil do kouta

A pohádka končí...

- O nějakých dvacet let později jistý mladý badatel našel v koutě jedné badatelny zaprášenou práci pana Christiana Grama.
- Jak si to tak pročítal, pokyvoval hlavou a říkal si – hm, nebylo to špatné, jen to chtělo něco přidat.
- A tak na závěr procesu Gramova barvení přidal dobarvení **safraninem** (nebo **Gabbetem** čili **karbofuchsinem**). Sice obarvil na červeno nejen odbarvené bakterie, ale i epitelie, ale to mu vůbec nevadilo. Vždyť o přítomnosti epitelí ve vzorku může být užitečné vědět!
- **A tak vzniklo Gramovo barvení v dnešní podobě.**

Prof. Hans Christian Gram



Hans Christian Joachim Gram (13. září 1853 – 14. listopadu 1938) byl dánský bakteriolog. Gram studoval botaniku na Kodaňské Univerzitě a byl botanickým asistentem zoologa Japeta Steenstrupa. V roce 1878 začal studovat medicínu a promoval 1883. V roce 1884 v Berlíně vyvinul metodu, která dnes slouží k rozlišení dvou hlavních tříd bakterií. V roce 1891 se Gram stal přednášejícím farmakologie, a v témže roce byl jmenován profesorem Kodaňské univerzity. V roce 1900 převzal vedení farmakologického ústavu.

en.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram.

Přehled metod

- **Metody přímé**

- **Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (například nějaký bakteriální jed – toxin)
- **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem (močí, krví, výtěrem z krku a podobně)
- **Identifikace kmene** – určení vypěstovaného izolátu

- **Metody nepřímé**

- **Hledáme protilátky**. Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, odezvou na činnost mikroba

Přehled metod přímého průkazu

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu	ano	ano
Pokus na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne*

*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

Mikrobiologická laboratoř



Co vidíme v mikroskopu

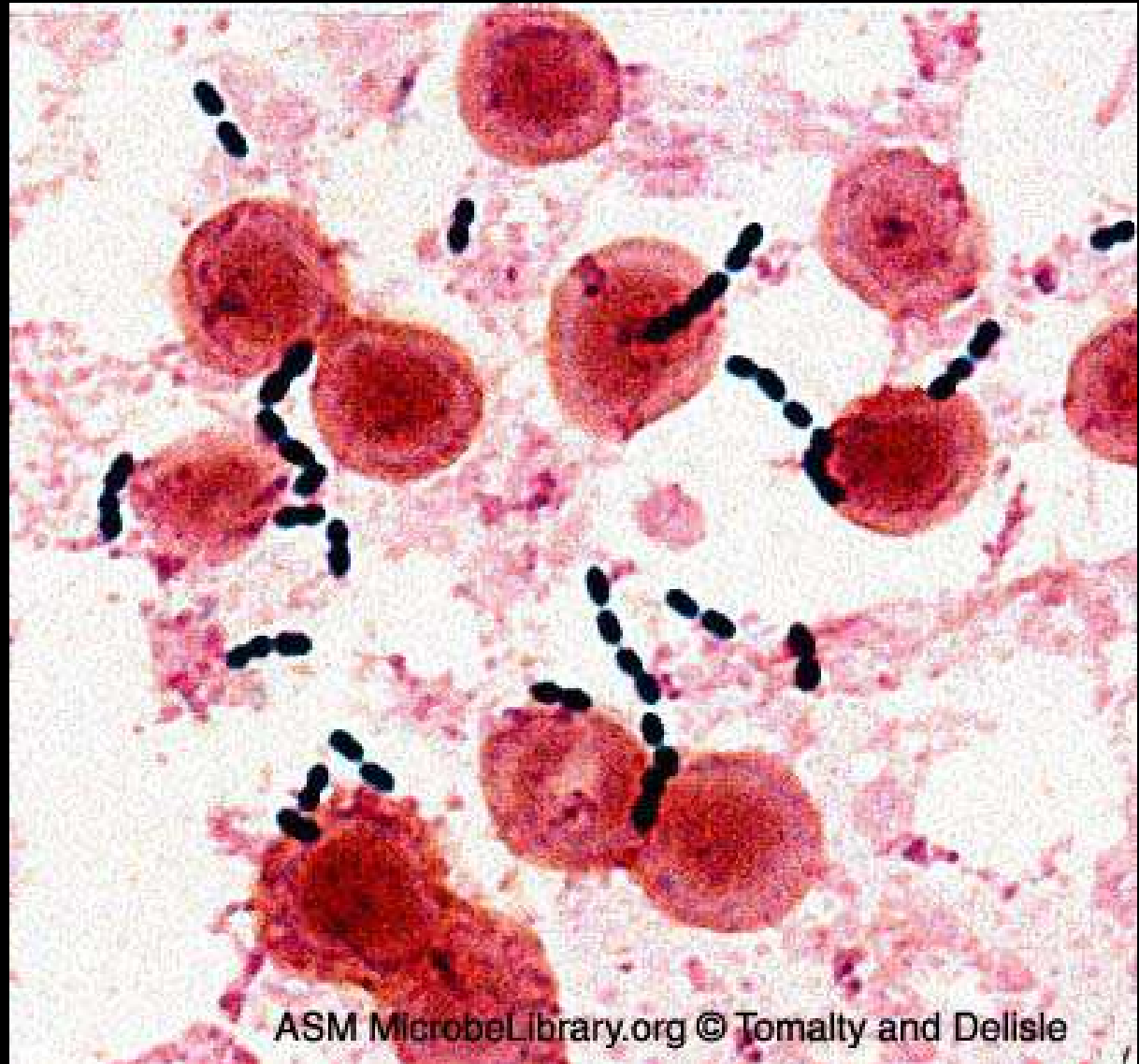
- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **V případě mikroskopování vzorku** můžeme vidět
 - **mikroby** – nemusí tam být žádné, a může tam být i klidně deset druhů
 - **buňky makroorganismu** – nejčastěji epitelie a leukocyty, někdy erytrocyty
 - **jiné struktury**, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně

Typy mikroskopie

- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů
- **Optická mikroskopie**
 - **Nativní preparát** - na velké a/nebo pohyblivé mikroby
 - **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
 - **Fixované a barvené preparáty**, například:
 - Barvení dle Grama – nejdůležitější bakteriologické
 - Barvení dle Ziehl-Neelsena – např. u bacilů TBC
 - Barvení dle Giemsy – na některé prvoky

Gramem barvený preparát

Koky v řetízcích
~~Streptokoky~~ rodu
Enterococcus

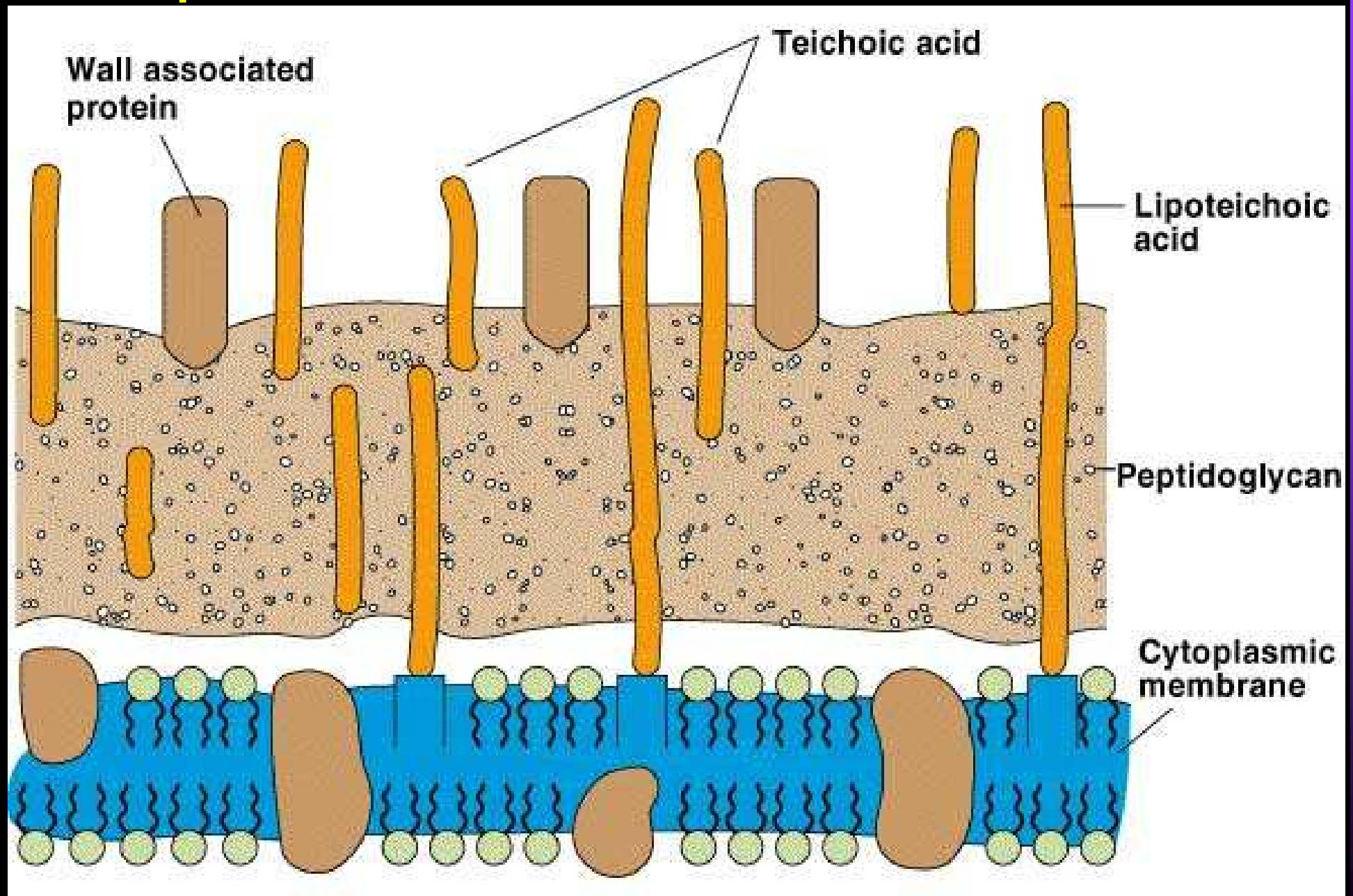


ASM MicrobeLibrary.org © Tomalty and Delisle

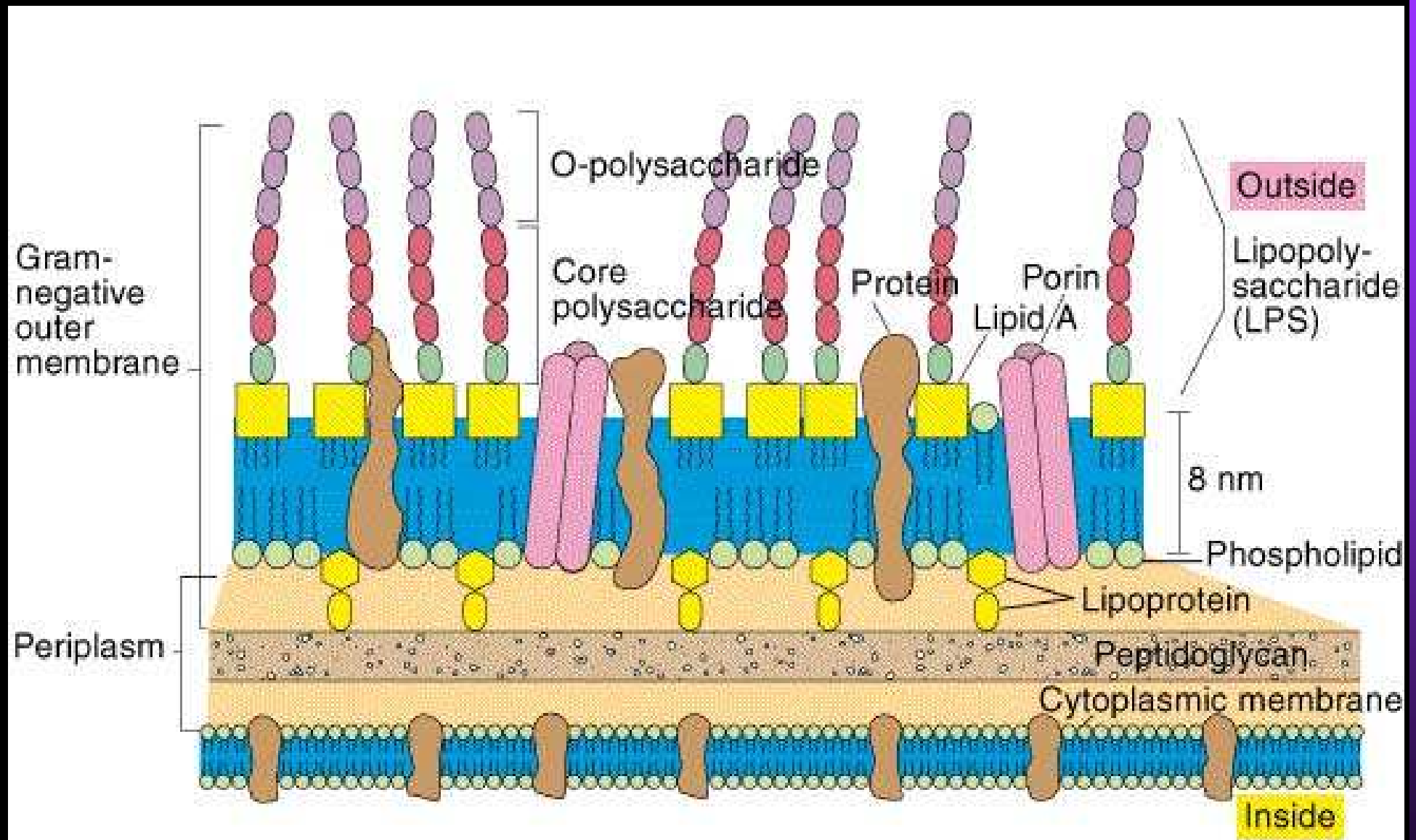
Buněčná stěna bakterií

- Na světě jsou bakterie, které jsou **mechanicky odolné**, jejich buněčná stěna je **silná a jednoduchá**. Říkáme jim **grampozitivní**.
- Na světě jsou ale také bakterie, které jsou spíše **chemicky odolné**, jejich buněčná stěna je **tenčí, ale složitější**. Říkáme jim **gramnegativní**.
- Kromě těch i oněch existují ještě takzvané **Gramem se nebarvící bakterie**.

Grampozitivní stěna



Gramnegativní stěna



Gramovo barvení - princip

- Grampozitivní bakterie mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu. Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violet' a po upevnění této vazby Lugolovým roztokem se neodbarví ani alkoholem. Gramnegativní bakterie se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeně safraninem.

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violet'	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

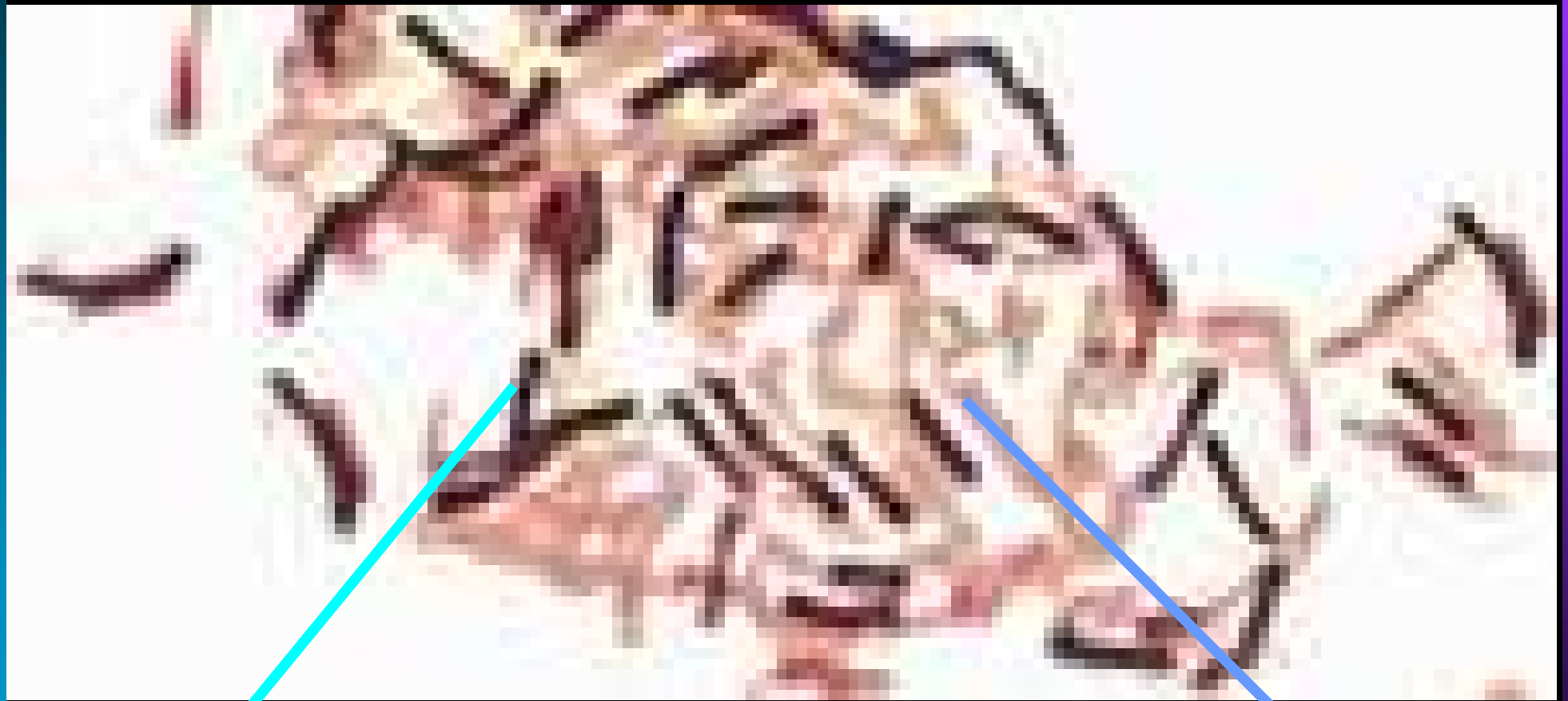
Vsuvka: Lugolův roztok je směs I_2 a KI

Jean Guillaume Auguste Lugol (18. 8. 1786 – 16. 9. 1851) byl francouzský lékař. Narodil se v Montaubanu. Studoval medicínu v Paříži a promoval v roce 1812. Roku 1819 se stal ordinářem v Nemocnici svatého Ludvíka, kde působil až do důchodu. Zajímal se o tuberkulózu a měl přednášku na Královské akademii věd v Paříži, kde se zastával čistého vzduchu, cvičení, studených koupelí a léků. Publikoval čtyři knihy o tuberkulózním onemocnění a jeho léčbě (1829, 1830, 1831, 1834). Navrhl, že by se jeho jódový roztok mohl používat k léčbě tuberkulózy. To tehdy vzbudilo velkou pozornost. I když se Lugolův roztok k léčbě TBC nehodil, byl zato Plummerem s úspěchem použit k léčbě thyreotoxikózy.



http://en.wikipedia.org/wiki/Jean_Guillaume_Auguste_Lugol

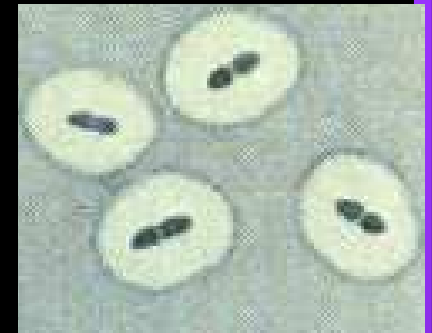
Vzhled směsi grampozitivních a gramnegativních bakterií



G+

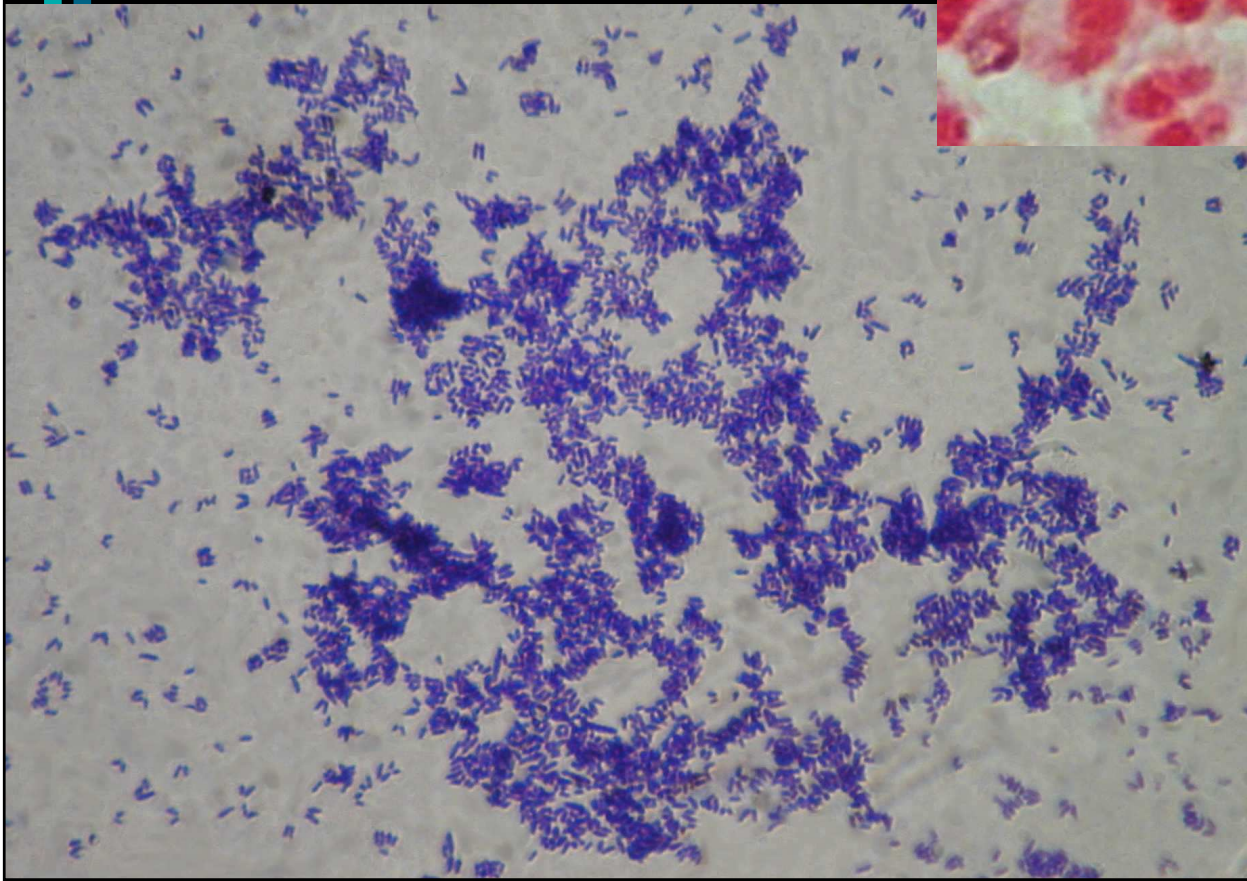
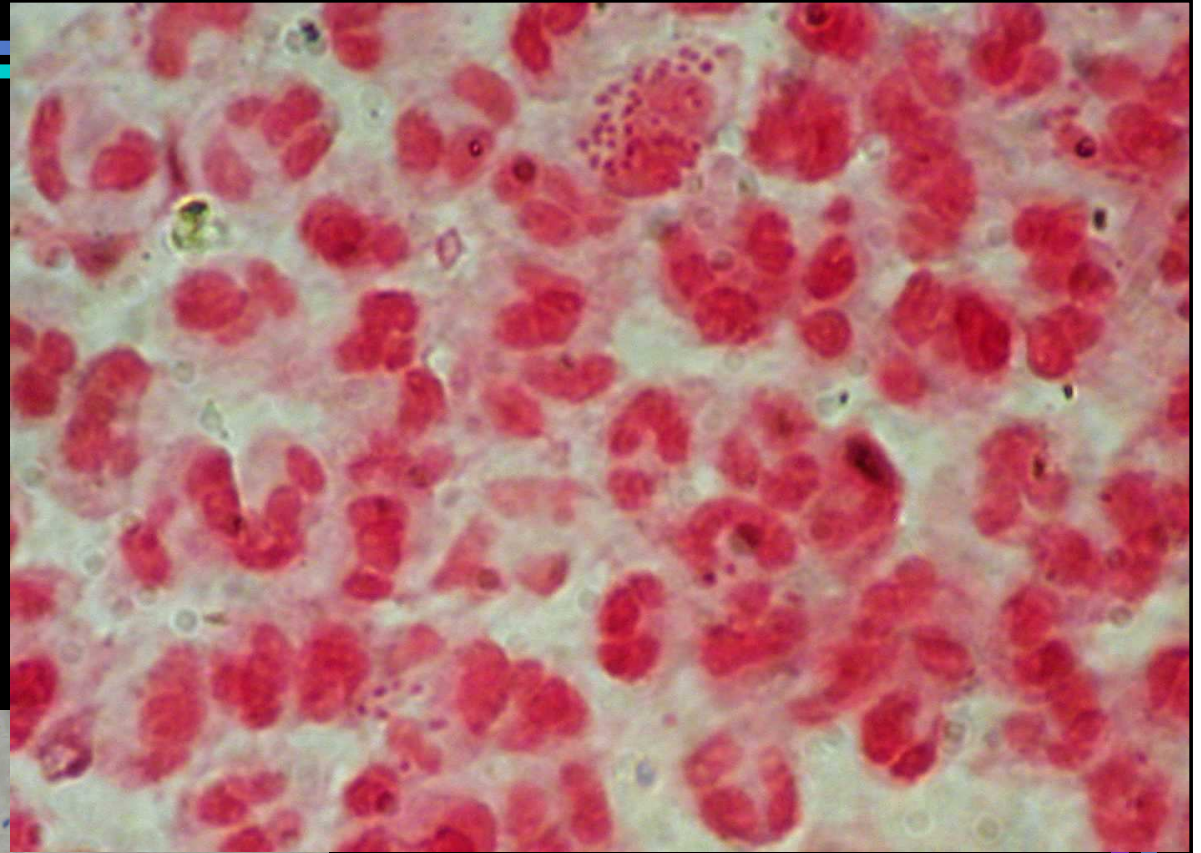
G-

Pouzdro a biofilm



- **Pouzdro** obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici. Není to už integrální součást bakteriální buňky, spíš nánosy molekul (většinou polysacharidů), které buňku chrání
- **Biofilm** je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu. Biofilm je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě

Mikroskopie
vzorku
Úkol 1



Mikroskopie
kmene
Úkol 2

Úkol 1

- Do mikroskopu nainstalujte hotové preparáty z klinických vzorků
- Nezapomeňte na kapku imerzního oleje
- Použijte imerzní objektiv, který zvětšuje $100 \times$ (celkové zvětšení $1000 \times$)
- **Po použití sklíčko nevyhodíte, bude sloužit pro další skupiny praktik!**

Sklíčko z horní části neotírejte, abyste nesesetřeli preparát. Případně ho můžete očistit zespodu, je-li od oleje

Před dalším úkolem si zopakujeme přípravu fixovaného preparátu

1. Na sklíčko kápněte malou kapku fyziologického roztoku
2. Vyžíhejte si kličku a nechte chvíli zchladnout
3. Kličkou opatrně seberte trošičku hmoty mikrobů (kmeny A – E)
4. Rozmíchejte v kapce
5. Kličku opět vyžíhejte a uložte zpět do stojanu
6. Kapku nechte uschnout nebo sušte KOLEM plamene kahanu
7. Sklíčko se zaschlou kapkou fixujte protažením plamenem
8. Sklíčko přeneste do dřezu k barvení

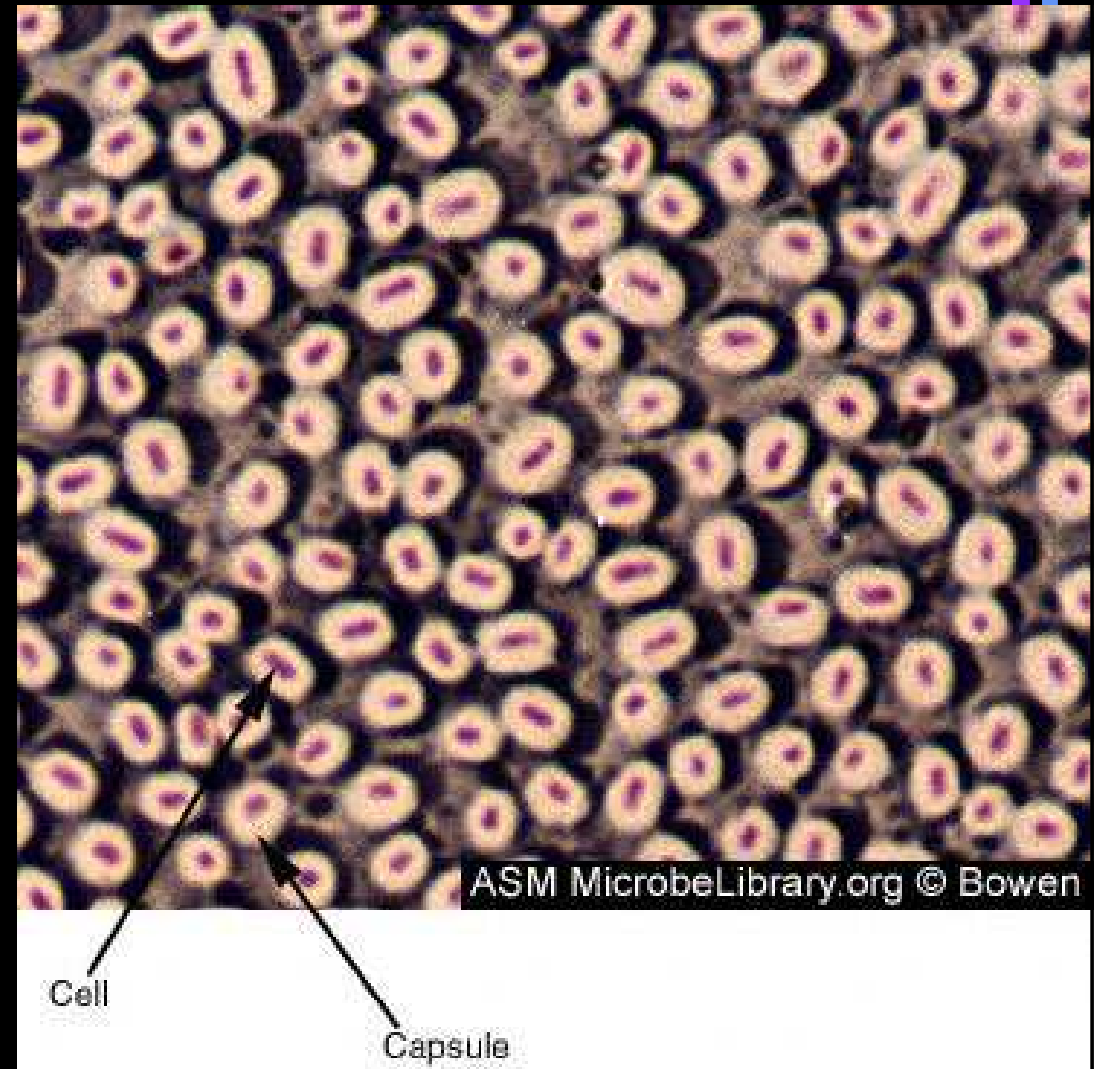
Úkol 2 – vlastní Gramovo barvení

- **Genciánová violet' (20 –) 30 vteřin**
- opláchnout vodou – lze vynechat
- **Lugol (20 –) 30 vteřin**
- opláchnout vodou – lze vynechat
- **Alkohol 15 (- 20) vteřin**
- opláchnout vodou – nezbytné!!!
- **Safranin 60 – 120 vteřin**
- opláchnout vodou
- osušit filtračním papírem
- mikroskopovat jako v prvním úkolu

Úkol 3 – barvení pouzder

V barvení dle Burriho byly nabarveny bakterie na červenou a pozadí dobarveno tuší; mikroskopista pak tuší pouzdro tam, kde se nic neobarvilo.

Prohlédněte si preparát, demonstračně připravený asistentem, a zakreslete do protokolu.



Přeji Vám
hezký
zbytek
dne...

