



ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ  
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

**Μικροσκοπική εξέταση νωπού  
παρασκευάσματος.  
Χρώσεις μικροβίων και  
διαγνωστικές εφαρμογές.**

*Δρ Σοφία Τσιπλάκου  
Βιοπαθολόγος, Επιμελήτρια Α΄  
Μικροβιολογικού Εργαστηρίου  
Νοσοκομείου «ΚΑΤ»*

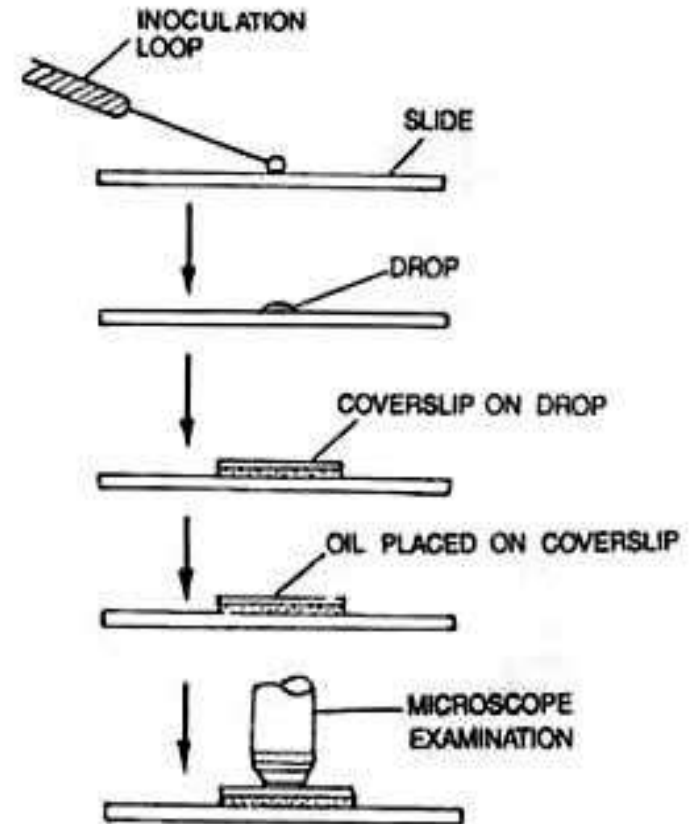
# Μικροσκοπική εξέταση

- Ποιότητα, καταλληλότητα δείγματος
- Ύπαρξη, αριθμό πυοσφαιρίων
- Παρουσία μικροοργανισμών
- Είδος, μορφή, διάταξη, κινητικότητα μικροοργανισμών

# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

*Με NaCl 0,85%*

- Εξέταση ζώντων μικροοργανισμών
- Κίνηση, μορφολογία
- Μειονέκτημα: στεγνώνει εύκολα

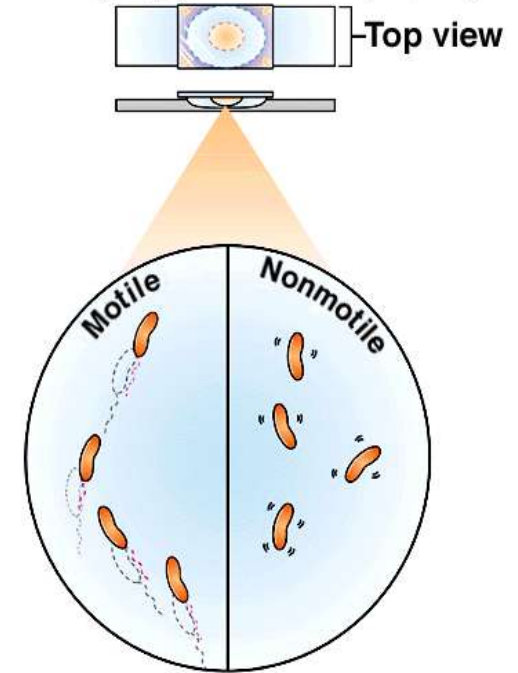


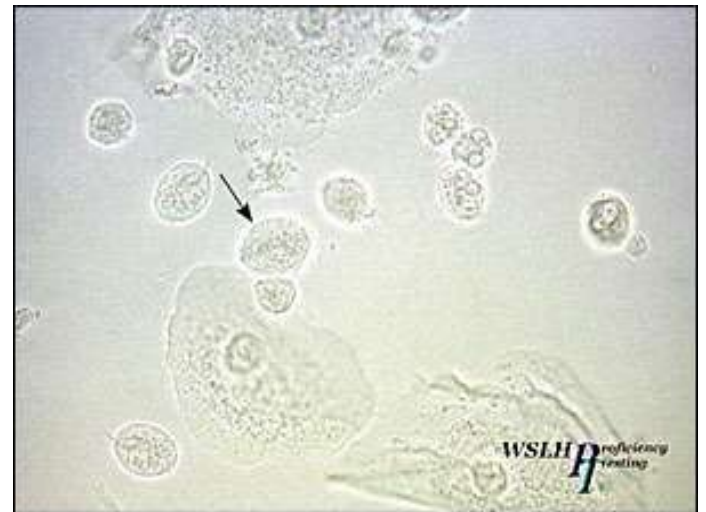
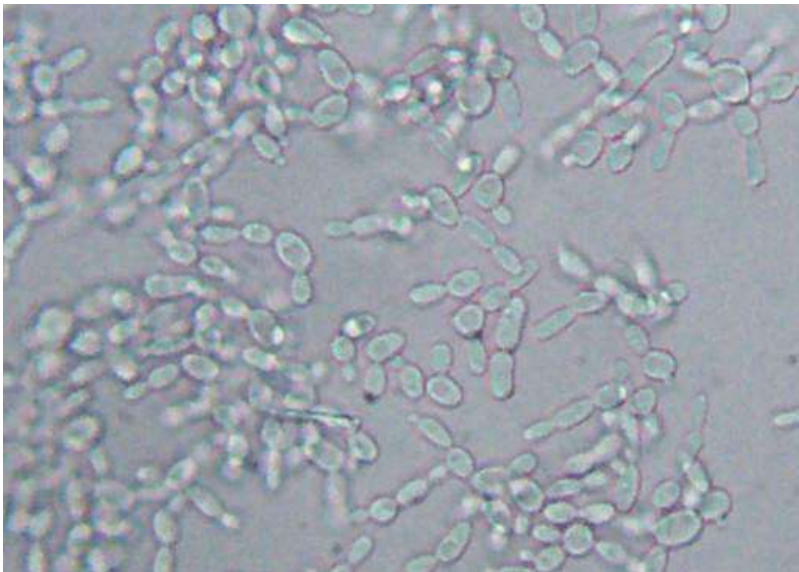
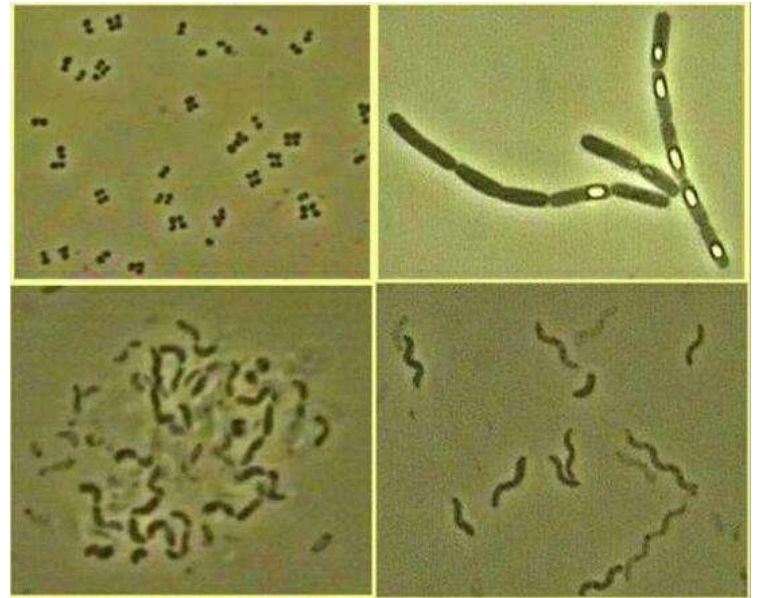
## *Hanging drop procedure*

- Κινητικότητα μικροοργανισμών
- Διατηρείται περισσότερο χρόνο

Kathleen Park Talaro and Arthur Talaro, *Foundations in Microbiology*, 3e Copyright © 1999 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

**Hanging drop slide**





<http://commons.wikimedia.org>  
<http://www.biology.ed.ac.uk>

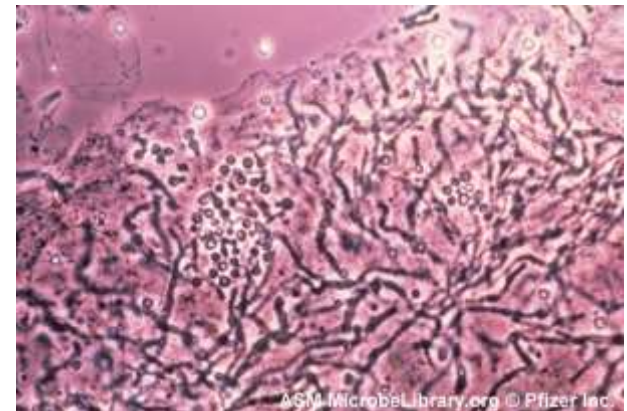
# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

## Με διάλυμα ΚΟΗ 10%

- Λέπια δέρματος, νύχια, τρίχες
- Διαλύει την κερατίνη και τα περισσότερα οργανικά υποστρώματα του κλινικού δείγματος εκτός από τους μύκητες (χιτίνη κυτταρικού τοιχώματος)
- Η διαύγαση του κλινικού δείγματος ενισχύεται με θέρμανση
- Προσθήκη μαύρης μελάνης Parker για καλύτερη διάκριση της *Malassezia furfur* σε ξέσματα δέρματος



<http://www.mycology.adelaide.edu.au>

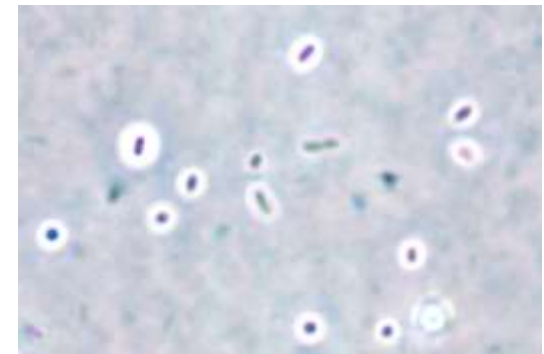
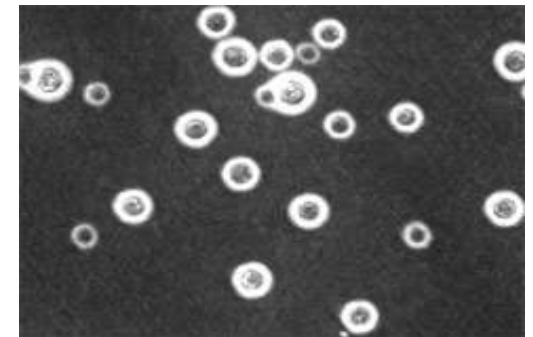


<http://www.microbelibrary.org>

# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

## Με σινική μελάνη ή νιγροσίνη (India Ink Preparation)

- Ανίχνευση των ελυτροφόρων κυττάρων
  - *Cryptococcus neoformans*
- Σε ENY, πτύελα, άλλες εκκρίσεις
- Το έλυτρο δεν προσλαμβάνει τα σωματίδια του άνθρακα της σινικής μελάνης, έτσι δημιουργείται μια διαυγής άλως γύρω από τα κύτταρα



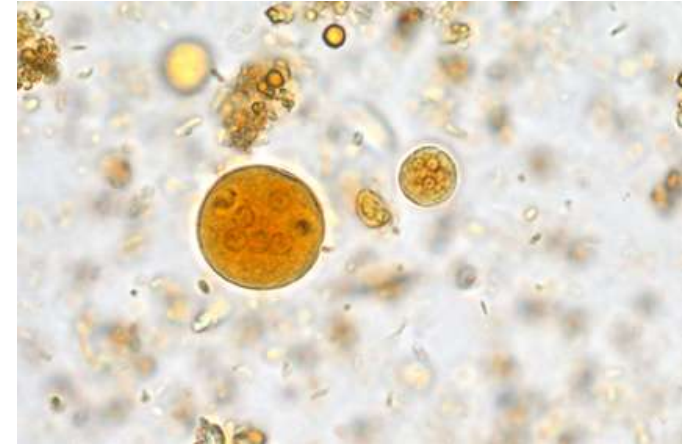
Έλυτρο *Klebsiella pneumoniae*

# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

## Με διάλυμα ιωδίου

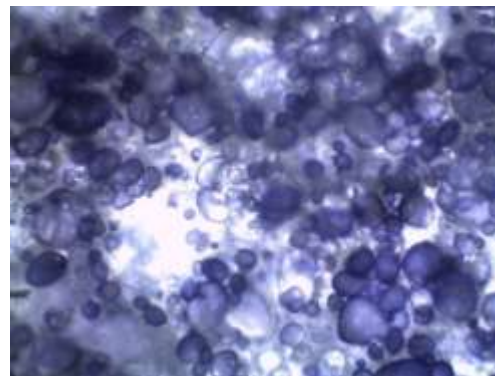
(Lugol's iodine, αραιωμένο 1:5)

- Κόπρανα: πρωτόζωα ή ωάρια ελμίνθων
  - χρωματίζονται οι πυρήνες και τα κυτταροπλασματικά στοιχεία



Κύστες *Entamoeba coli*  
(<http://www.atlas-protozoa.com>)

- Κοκκία αμύλου





# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

ΣΚΟΤΕΙΝΟ ΟΠΤΙΚΟ ΠΕΔΙΟ

(*Dark field examination*)

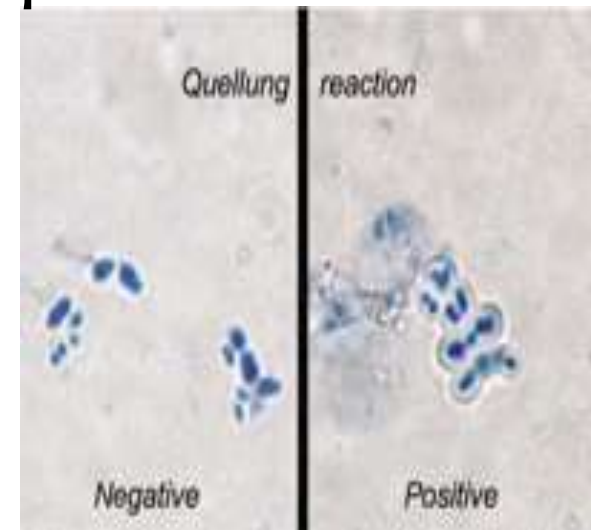
- *Treponema pallidum*: λευκά διαθλαστικά σώματα που κινούνται
- Εξίδρωμα από το συφιλιδικό έλκος μικροσκόπηση με x400 ή x1000 και συμπυκνωτή σκοτεινού πεδίου



# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

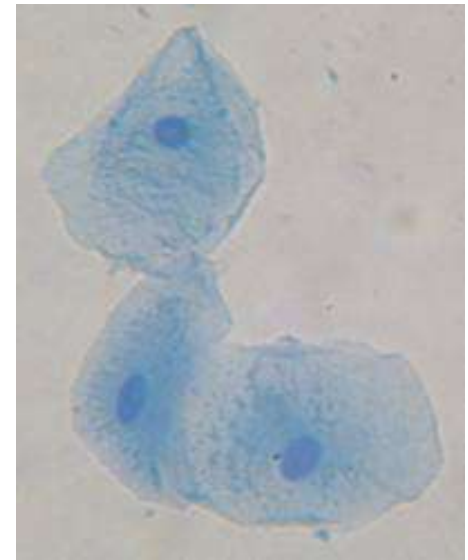
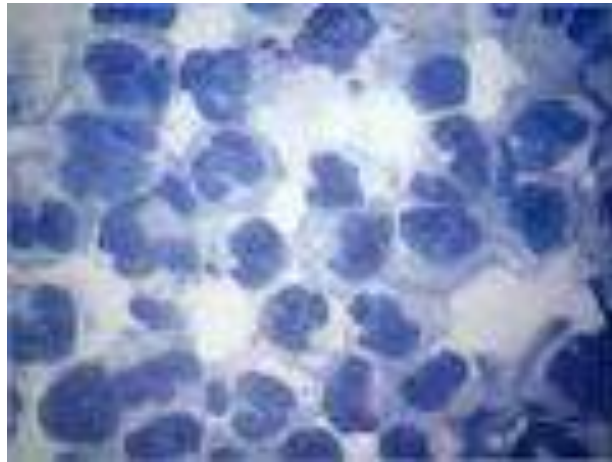
## Αντίδραση εξοίδησης του ελύτρου (*Neufeld's quellung reaction*)

- Με ορό που περιέχει ομόλογο αντικαψιδικό αντίσωμα
- *Streptococcus pneumoniae*,  
*Haemophilus influenzae*
- Μικροσκόπηση με x1000



# Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος

Κυανό του μεθυλενίου

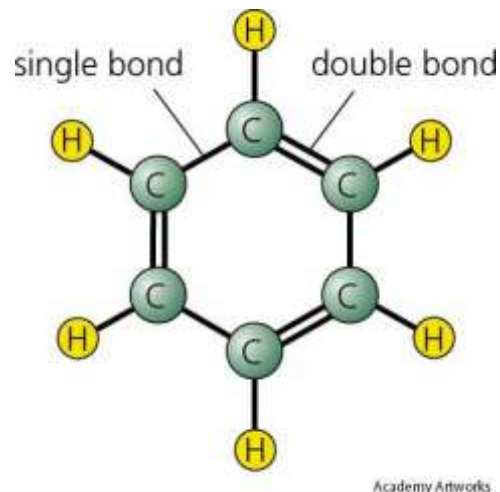


# Χρωστικές

- Είναι παράγωγα της πίσσας
- Αποτελούνται από 2 ή περισσότερους δακτυλίους βενζολίου που συνδέονται με χρωμοφόρα
- **Χρωμοφόρες ομάδες** είναι χημικές ομάδες που απορροφούν το φως και δίνουν χρώμα (C=C, C=O, C=S, C=NH, N=N, NO<sub>2</sub>)
- Η ένταση του χρώματος σχετίζεται με τον αριθμό των χρωμοφόρων
- **Αυξόχρωμες ομάδες** είναι κορεσμένες ομάδες με μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων που συνδέονται με τα χρωμοφόρα και προκαλούν υπερχρωμία, δηλαδή αύξηση της έντασης απορρόφησης (NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, OH, SO<sub>3</sub>H, NO<sub>2</sub>)

# Χρωστικές

➤ Βενζόλιο:  $C_6H_6$

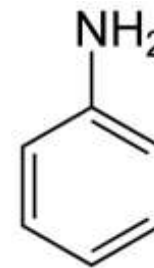
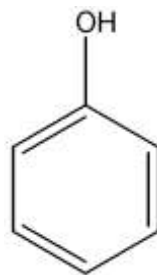
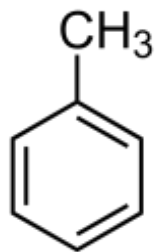


Αντικατάσταση H από

$CH_3$ : τολουόλιο

$OH$ : φαινόλη

$NH_2$ : ανιλίνη



<http://en.wikipedia.org>

# Χρωστικές

Φέρονται με τη μορφή σκόνης ή κρυστάλλων

- Φυσικές
  - Ζωικής
  - Φυτικής προέλευσης (αιματοξυλίνη, καρμίνιο)
- Τεχνητές (με τη μορφή αλάτων)
  - Βασικές
  - Όξινες
  - Ουδέτερες
- Χρωστικά διαλύματα
  - Μητρικά διαλύματα: κορεσμένα διαλύματα χρωστικών σε αιθυλική αλκοόλη 95°
  - Υδατικά διαλύματα: αραίωση μητρικών διαλυμάτων με αποσταγμένο νερό

# Χρωστικές της ανιλίνης

## Βασικές:

- Αποτελούνται από θετικό ιόν (cationic auxochrome)
- Συνδέονται με τη χρωματίνη του πυρήνα
  - κυανό του μεθυλενίου,
  - κρυσταλλικό ιώδες,
  - κυανό της τολουιδίνης,
  - ιώδες της γεντιανής,
  - πράσινο του μαλαχίτη,
  - σαφρανίνη,
  - θειονίνη,
  - βασική φουξίνη

# Χρωστικές της ανιλίνης

## Όξινες:

- Αποτελούνται από αρνητικό ιόν (anionic auxochrome)  
Συνδέονται με το κυτταρόπλασμα
  - κυανό του μεθυλίου,
  - όξινη φουξίνη,
  - ηωσίνη



# Χρωστικές της ανιλίνης

## Ουδέτερες:

- Προέρχονται από ανάμιξη βασικής και όξινης χρωστικής
- Για τη χρώση και του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος (χρώση παρασίτων και αίματος)
  - *Romanowsky*: ηωσίνη και κυανό του μεθυλενίου
  - *Giemsa*: ηωσίνη και κρυσταλλικό ιώδες

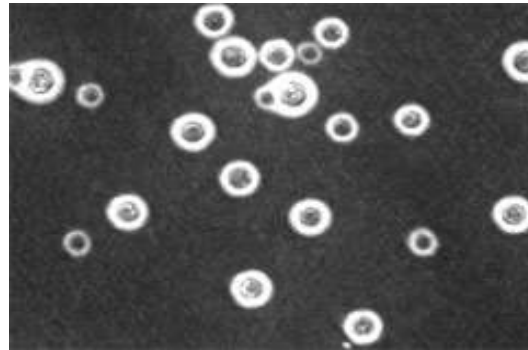
- Τα περισσότερα μικρόβια χρωματίζονται με τις βασικές χρωστικές της ανιλίνης
  - περιέχουν μεγάλο ποσό ριβονουκλεϊνικών οξέων και
  - η βακτηριακή επιφάνεια είναι αρνητικά φορτισμένη και απωθούνται οι όξινες χρωστικές

# Χρώσεις μικροβίων

- Απλές
- Σύνθετες
- Ειδικές
- Χρώσεις με φθοριοχρώματα

# Χρώσεις μικροβίων

- **Αρνητικές:** χρωματίζεται το περιβάλλον του βακτηρίου ενώ το κύτταρο παραμένει άχρωμο
  - Διάλυμα σινικής μελάνης ή νιγροσίνης



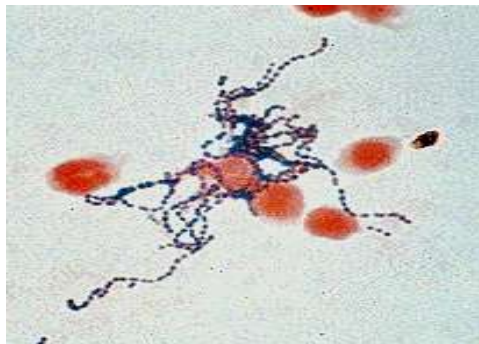
*Cryptococcus neoformans*

# Χρώσεις μικροβίων

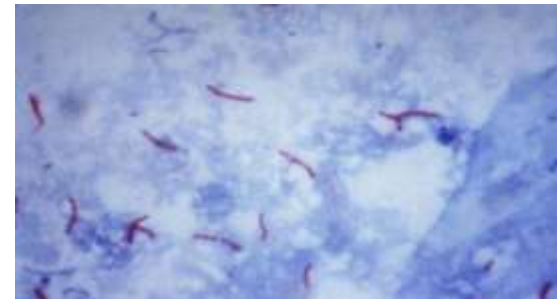
- **Θετικές:** χρωματίζονται τα κύτταρα των βακτηρίων
  - **Απλές:** κυανό του μεθυλενίου
  - **Σύνθετες:** Gram, Ziehl-Neelsen



*Corynebacterium diphtheriae*



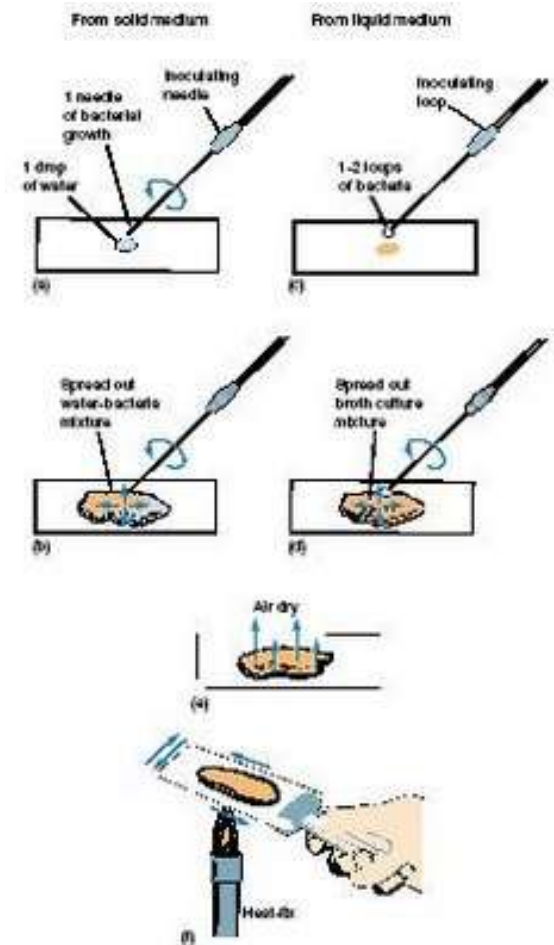
*Streptococcus pyogenes*



*Mycobacterium tuberculosis*

# Τεχνική χρώσης παρασκευασμάτων

- Παρασκευή σε αντικειμενοφόρο πλάκα  
(μία σταγόνα από υγρό υλικό ή μία αποικία αναμιγνύεται με μία σταγόνα φ.ο.)
- Αποξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου
- Μονιμοποίηση του παρασκευάσματος με ελαφρά θέρμανση σε φλόγα ή χημικά με αιθανόλη, μεθανόλη, φορμαλδεύδη, πικρικό οξύ
- Χρώση

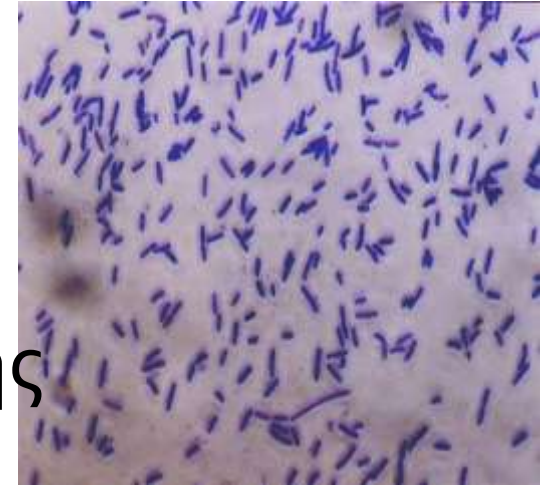


# Χρώσεις μικροβίων

- Απλές
- Σύνθετες
- Ειδικές
- Χρώσεις με φθοριοχρώματα

# Απλές

- Είναι υδατικά ή αλκοολικά διαλύματα μιας μόνο βασικής χρωστικής
  - κυανό του μεθυλενίου, βασική φουξίνη, κρυσταλλικό ιώδες
- Μορφολογία των βακτηρίων (σχήμα, διάταξη)
- Εφαρμόζονται για ορισμένο χρονικό διάστημα (3 min), ξέπλυμα, στέγνωμα, μικροσκόπηση





# Χρώσεις μικροβίων

- Απλές
- **Σύνθετες**
- Ειδικές
- Χρώσεις με φθοριοχρώματα

# Σύνθετες

- Κύρια χρωστική
- Σταθεροποιητής
- Αποχρωματισμός (αιθανόλη, ακετόνη)
- Χρώση με αντιθέτου χρώματος χρωστική

# Χρώση κατά Gram

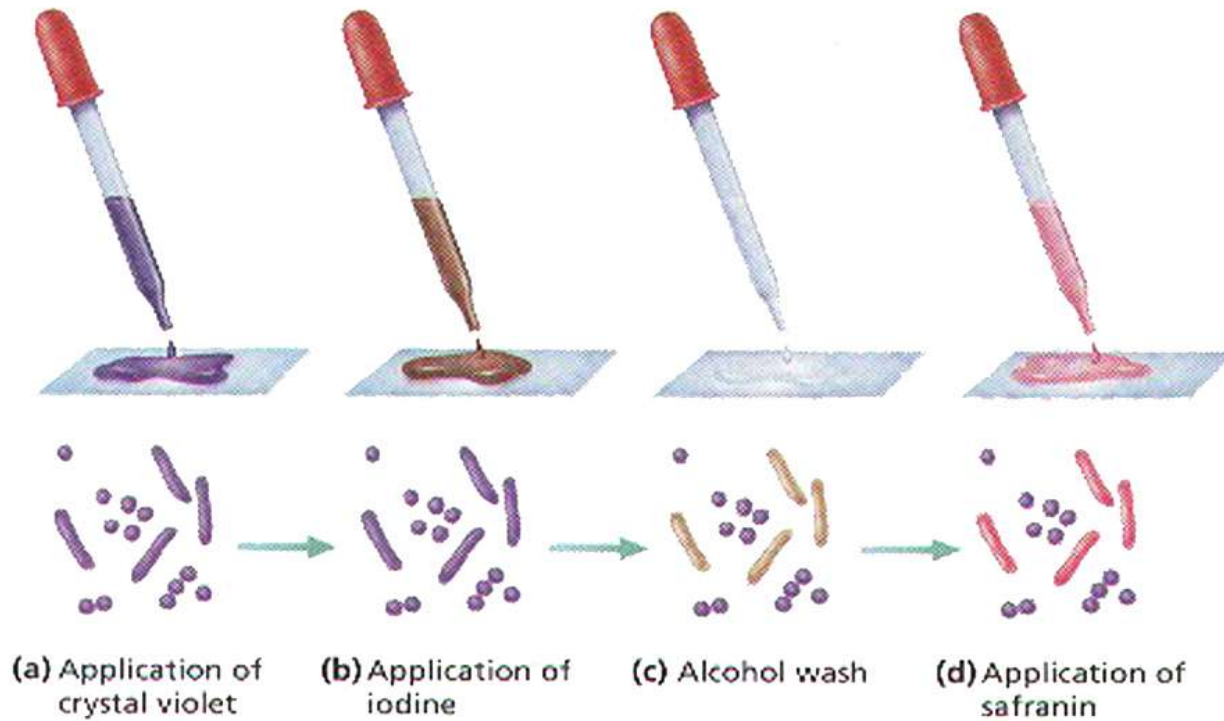
- Αναπτύχθηκε το 1884 από το Δανό βακτηριολόγο Hans Christian Gram (1853 –1938)
- Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρώση στη Μικροβιολογία
- Ταξινομεί τα βακτήρια σε δύο μεγάλες κατηγορίες: **θετικά** και **αρνητικά** κατά Gram
- Άμεση χρώση βιολογικών υλικών (ΕΝΥ, αίμα, αρθρικό υγρό)
- Άμεση απάντηση για την σωστή επιλογή θεραπείας

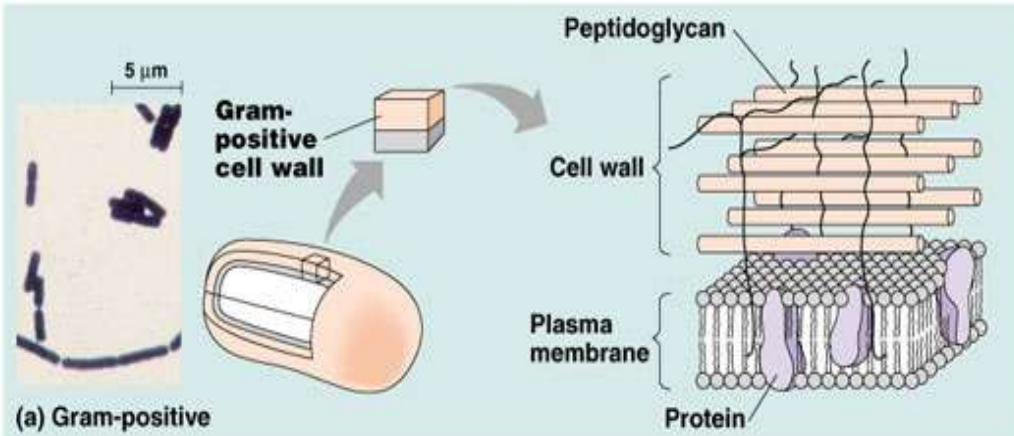


# Τεχνική χρώσης κατά Gram

- Υδατικό διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους 1 min
- Ξέπλυμα με νερό
- Διάλυμα ιωδίου 1 min
- Ξέπλυμα με νερό
- Αποχρωματισμός με αλκοόλη ή ακετόνη 10-30 s
- Ξέπλυμα με νερό
- Μεταχρωματισμός με υδατικό διάλυμα σαφρανίνης 1 min
- Ξέπλυμα με νερό
- Στέγνωμα
- Μικροσκόπηση (1000 x με καταδυτικό φακό)

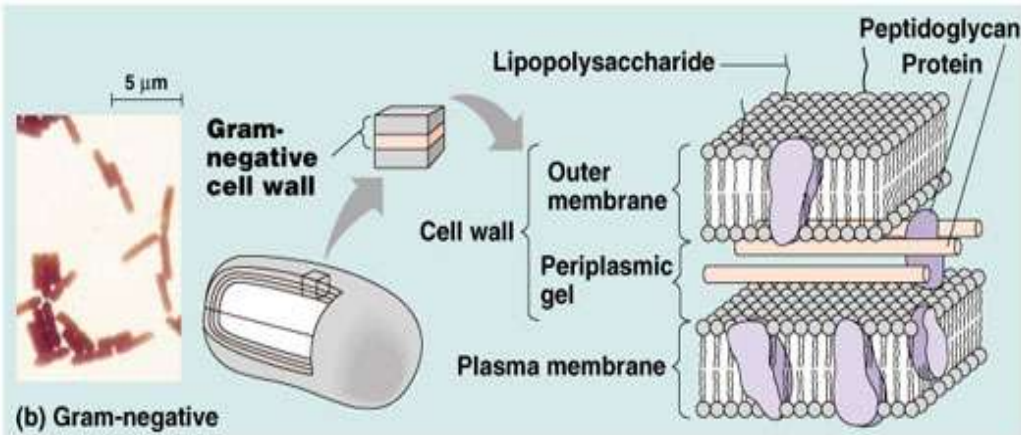
# Τεχνική χρώσης κατά Gram





## Θετικά κατά Gram βακτήρια

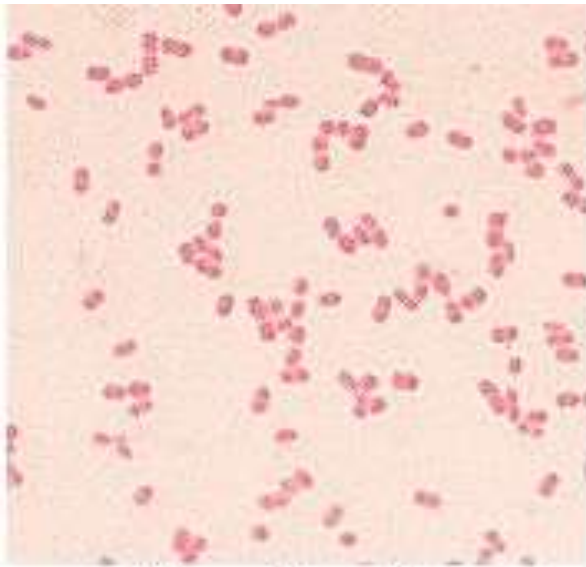
Διατηρούν το χρώμα της ιώδους χρωστικής γιατί το σύμπλοκο χρωστικής ιωδιούχου διαλύματος δεν μπορεί να εξέλθει από το παχύ στρώμα της πεπτιδογλυκάνης



## Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Το σύμπλοκο εξέρχεται εύκολα από το κυτταρικό τοίχωμα γιατί κατά τον αποχρωματισμό ο οργανικός διαλύτης διαλύει τους λιποπολυσακχαρίτες του τοιχώματος.

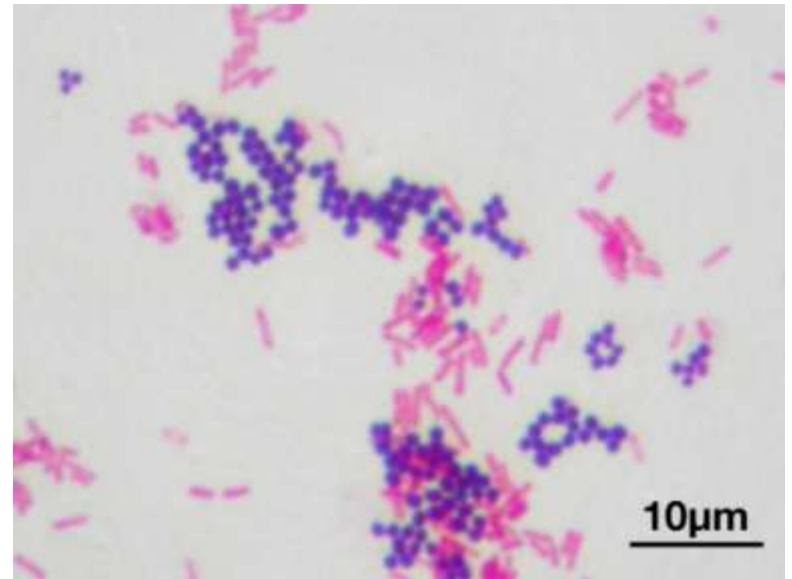
Μεταχρωματισμός με σαφρανίνη ή φουξίνη.



Gram Negative



Gram Positive

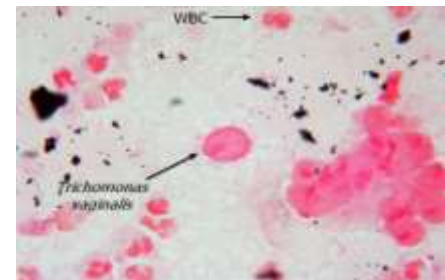
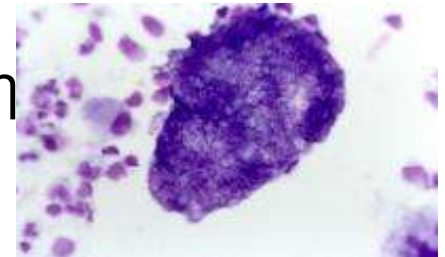
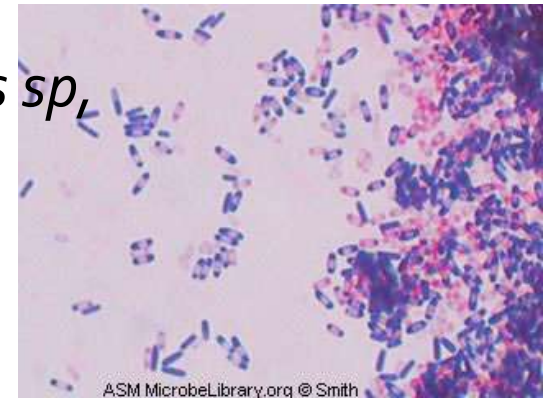


# Ευαισθησία και ειδικότητα της χρώσης κατά Gram

- Σωστή τεχνική
- Ποιοτικός έλεγχος
- Χρωματίζονται τα βακτήρια που βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης
- Τα χαρακτηριστικά των βακτηρίων επηρεάζονται από:
  - Ηλικία του καλλιεργήματος
  - Καλλιεργητικό υλικό
  - Ατμόσφαιρα επώασης
  - Παρουσία ανασταλτικών παραγόντων
  - Παρουσία φαγοκυττάρων
- Υπάρχουν πληθυσμοί θετικών κατά Gram βακτηρίων που χρωματίζονται αρνητικά κατά Gram
- Σε παλιά καλλιεργήματα μερικά θετικά κατά Gram βακτήρια παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό αρνητικών κατά Gram κυττάρων (*Bacillus sp, Clostridium sp*)



- Gram variable:
  - *Actinomyces sp*, *Arthobacter sp*, *Bacillus sp*,  
*Butyrivibrio sp*, *Clostridium sp*,  
*Corynebacterium sp*, *Mycobacterium sp*,  
*Propionobacterium sp*
- Δύκολα χρωματιζόμενα:
  - *Borellia sp*, *Mycoplasma sp*
- Μη χρωματιζόμενα:
  - *Treponema palidum*
- Μπορούν να χρωματιστούν με Gram χρώση
  - κύστεις *Pneumocystis carinii*,  
τριχομονάδες, *Strongyloides sp*,  
τροφοζώιτες *Toxoplasma gondii*



# Απάντηση μικροσκόπησης

## *Περιγραφική ως προς την μορφολογία*

- Gram (+) κόκκοι: σε ζευγάρια, σε αλυσίδες, σε αθροίσματα
- Gram (+) κοκκοβακτηρίδια, βάκιλλοι, βακτηρίδια κορυνόμορφα σε σχηματισμούς L ή V ή κινέζικα γράμματα
- Gram (-) διπλόκοκκοι, βακτηρίδια, βακτηρίδια νηματοειδή, κοκκοβακτηρίδια με πολυμορφισμό
- Βλαστοκύτταρα με εκβλαστήσεις ή/ και υφές

## *Ημιποσοτική ως προς τον αριθμό*

- σπάνια: < 1 μ/οπ
- λίγα: 1 -5 μ/ οπ
- αρκετά: 5 -10 μ/ οπ
- πολλά: >10 μ/οπ

# Οξεάντοχες χρώσεις

Οξεαντοχή είναι η φυσική ιδιότητα μερικών μικροοργανισμών να μην αποχρωματίζονται κατά τη διαδικασία της χρώσης κατόπιν επεξεργασίας με οξέα

# Χρώση κατά Ziehl–Neelsen

Επινοήθηκε το 1882 από τους Franz Ziehl και Friedrich Neelsen

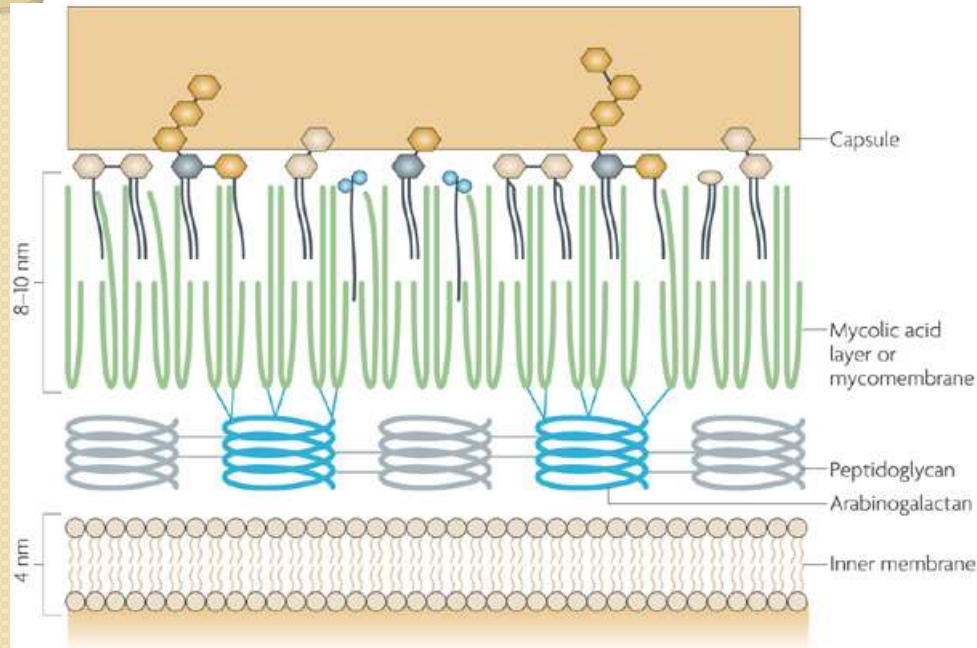
οξεάντοχοι μικροοργανισμοί

*Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces,*

ωοκύστες *Cryptosporidium parvum,*

κύστες *Cyclospora* και *Isospora belli*

# Τοίχωμα οξεάντοχων μικροοργανισμών



Nature Reviews | Microbiology

Περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις μυκολικού οξέος (60%)

Αποτρέπει την απορρόφηση χρωστικών ουσιών (όπως της χρώσης Gram)

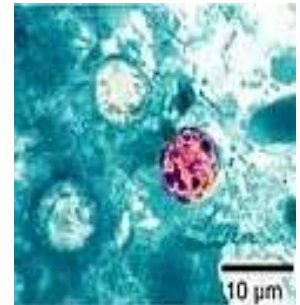
Είναι ενωμένο με την πεπτιδογλυκάνη

Όταν χρωματισθούν με θέρμανση με μία ισχυρή βασική χρωστική (φαινικούχος φουξίνη) που διαπερνά αυτό το τοίχωμα, σχηματίζεται ένωση που δεν αποχρωματίζεται με οξέα

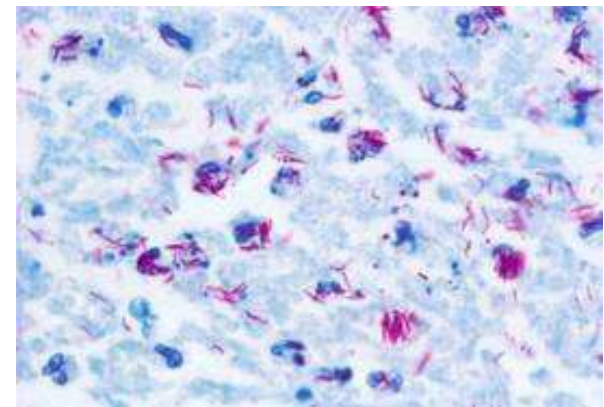
# Τεχνική χρώσης κατά Zielh–Neelsen

- Μονιμοποίηση παρασκευάσματος με μεθανόλη ή με θέρμανση
- Κάλυψη παρασκευάσματος με πυκνή φαινικούχο φουξίνη
- Θέρμανση της κάτω επιφάνειας του παρασκευάσματος με φλόγα μέχρι να εμφανιστούν ατμοί 5 min
- Ξέπλυμα με νερό αφού κρυώσει για 5 min
- Αποχρωματισμός με οξυρισμένο οινόπνευμα 15-20s
- Ξέπλυμα με νερό
- Μεταχρωματισμός με κυανό του μεθυλενίου 1 min
- Ξέπλυμα με νερό
- Στέγνωμα-Μικροσκόπηση
- Για τη μικροσκόπηση απαιτούνται τουλάχιστον 30 min

Τα οξεάντοχα βακτήρια χρωματίζονται  
κόκκινα



*Cyclospora*



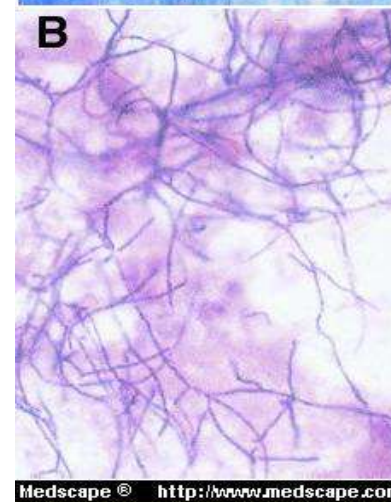
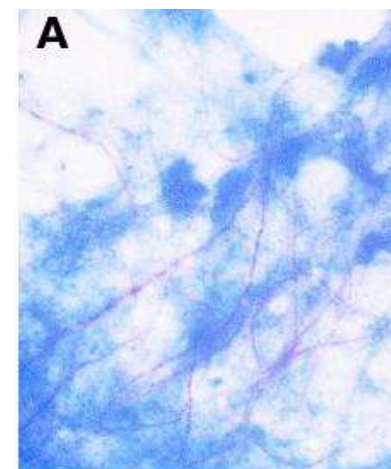
# Άλλες οξεάντοχες χρώσεις

## Τροποποιημένη Zielh–Neelsen

- Αποχρωματισμός με  $H_2SO_4$  2 -3 %  
διάλυμα αποχρωματισμού μικρότερης οξύτητας  
*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsucamurella*,  
*Gordonia*, *Diezia*

## Κατά Kinyoun

- Ιδιαίτερο διάλυμα φαινικούχου φουξίνης (μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινόλης και βασικής φουξίνης)
- Όχι θέρμανση
- Αποχρωματισμός με  $H_2SO_4$  1 %



*Nocardia* με χρώση κατά Kinyoun (A)  
και χρώση κατά Gram (B)  
<http://www.medscape.com/>

# Χρώσεις μικροβίων

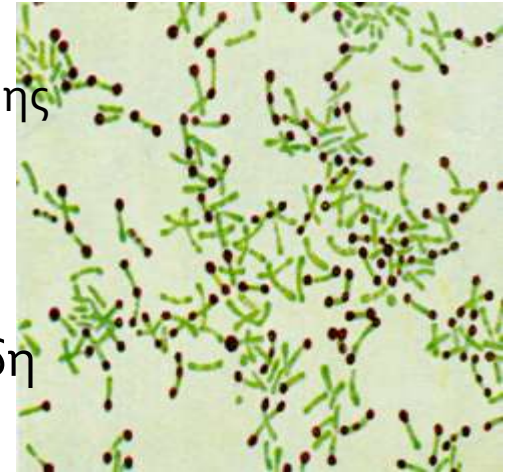
- Απλές
- Σύνθετες
- Ειδικές
- Χρώσεις με φθοριοχρώματα



# Ειδικές χρώσεις

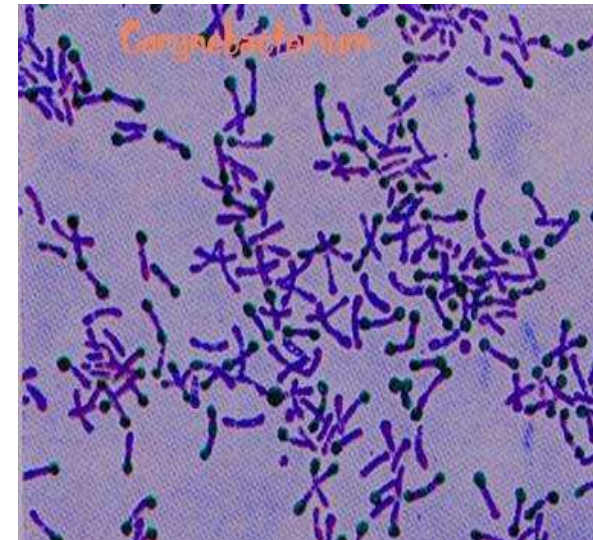
## Χρώσεις για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία κορυνοβακτηριδίων

- *Χρώση κατά Stoltenberg*
  - I: Πράσινο του μαλαχίτη και κυανό της τολουιδίνης
  - II: Αιματοξυλίνη
- Το κυτταρόπλασμα των κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται πράσινο, τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία χρωματίζονται ερυθροϊώδη
- *Χρώση κατά Albert*
  - I: Πράσινο του μαλαχίτη και κυανό της τολουιδίνης
  - II: Διάλυμα Lugol
- Το κυτταρόπλασμα των κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται πράσινο, τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία χρωματίζονται κυανομέλανα



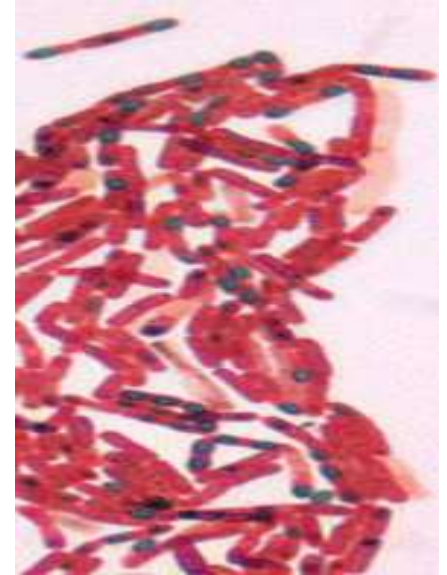
# Χρώσεις για τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία κορυνοβακτηριδίων

- *Χρώση κατά Neisser*
  - I: Κυανό του μεθυλενίου και κρυσταλλικό ιώδες
  - II: Χρυσοϊδίνη
- Το κυτταρόπλασμα των κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται καστανό, τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία χρωματίζονται κυανομέλανα
- *Χρώση κατά Loeffler*
  - I: Κυανό του μεθυλενίου II: Καυστικό κάλιο 1%
- Το κυτταρόπλασμα των κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται κυανό, τα μεταχρωματικά ή αλλόχρωμα κοκκία χρωματίζονται ερυθροϊώδη



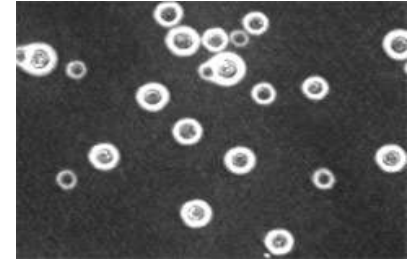
## Χρώση ενδοσπορίων

- *Bacillus sp, Clostridium sp.*
- *Χρώση κατά Schaeffer–Fulton*
  - I: Πράσινο του μαλαχίτη και θέρμανση II: Σαφρανίνη
- Το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κόκκινο και οι σπόροι πράσινοι
- *Χρώση κατά Moeller*
  - I: Φαινικούχος φουξίνη και θέρμανση II: Κυανό του μεθυλενίου κατά Loeffler
- Το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κυανό και οι σπόροι κόκκινοι



## Χρώση για το έλυτρο

- *Αρνητική χρώση*
  - Διάλυμα σινικής μελάνης ή νιγροσίνης
    - *Cryptococcus neoformans*
- *Χρώση κατά Muir*
  - Φαινικούχος φουξίνη, πρόστυμμα του Muir, κυανό του μεθυλενίου κατά Loeffler
- Τα κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα και το έλυτρο κυανό
- *Χρώση κατά Hiss*
  - Βασική φουξίνη και θειικός χαλκός
- Τα κύτταρα χρωματίζονται ερυθροϊώδη και το έλυτρο κυανό



## Χρώση για το έλυτρο

- *Χρώση κατά Maneval*
  - Ερυθρό του Κονγκό,  
βασική φουξίνη,  
χλωριούχος σίδηρος



- *Χρώση κατά Anthony*
  - Κρυσταλλικό ιώδες  
θειικός χαλκός

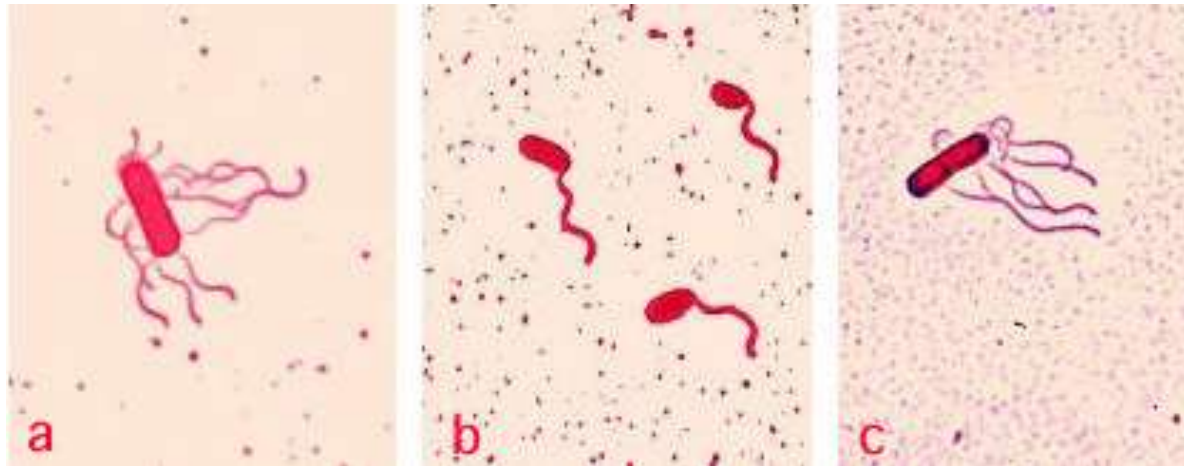


Τα κύτταρα χρωματίζονται ιώδη  
και το έλυτρο κυανό

## Χρώση για τα μαστίγια, βλεφαρίδες

- Χρώση Leifson
  - Χρώση Ryu
  - Χρώση κατά Rhodes
  - Τεχνική Mayfield and Innis
- 
- Είναι πολύ μικρά οργανίδια που πριν την χρώση πρέπει να σταθεροποιηθούν
  - Με την είσοδο της χρωστικής προκαλείται διόγκωση
  - Οι βλεφαρίδες χρωματίζονται κόκκινες
  - Εκτιμάται ο αριθμός τους και η κατανομή τους γύρω από το βακτηριακό κύτταρο

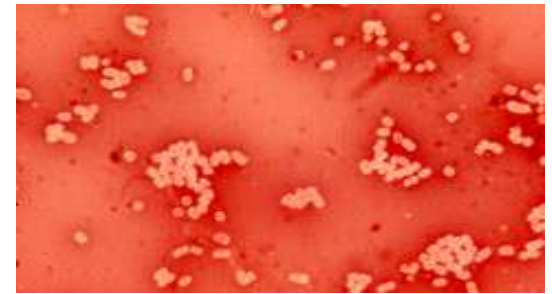
# Χρώση Leifson



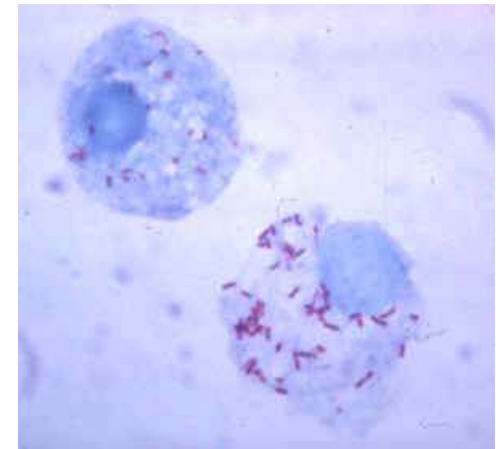
a. *Bacillus cereus*   b. *Vibrio cholerae*   c. *Bacillus brevis*

# Άλλες ειδικές χρώσεις

- Χρώση για *Chlamydia*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Legionella pneumophila*
  - Χρώση Gimenez
- Χρώση ιών, ρικετσιών
  - Χρώση κατά Castaneda
  - Χρώση κατά Macchiavello



*Legionella pneumophila*



*R. rickettsii*

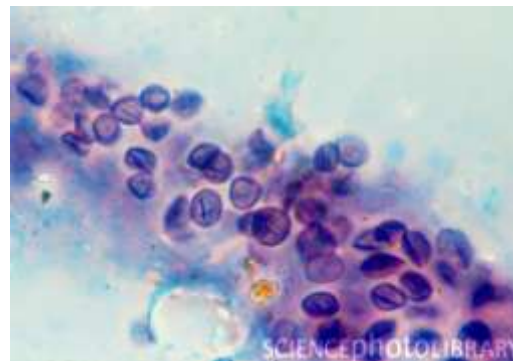


- Χρώση για *Pneumocystis sp.*

- Χρώση Gomori (αργυρούχος μεθαμίνη)



- Κυανό της τολουιδίνης  
(σε δείγματα του αναπνευστικού)



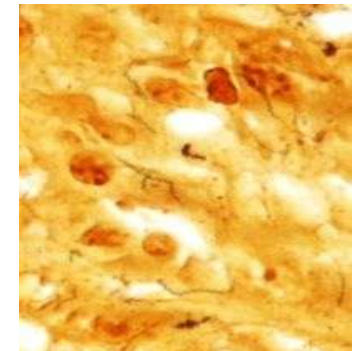
- Χρώση για το Τρεπόννημα το ωχρο

- Χρώση με εναμμώνιο  
νιτρικό άργυρο κατά Fontana

- Χρώση Dieterle

Το Τρεπόννημα χρωματίζεται σκούρο  
καφέ ή μαύρο, ενώ το υπόστρωμα  
καστανό

- Χρώση με σινική μελάνη



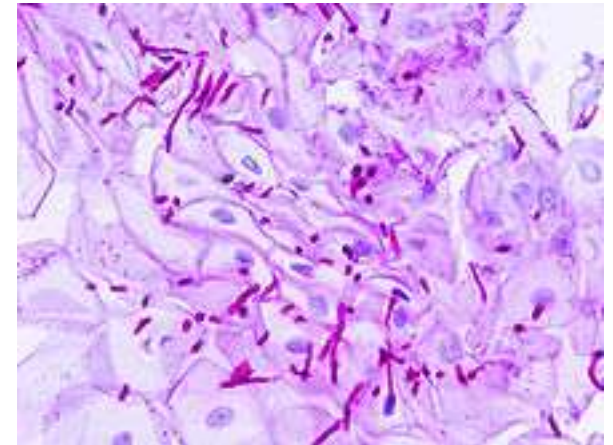
- Χρώση για μύκητες

- Χρώση λακτοφαινόλης

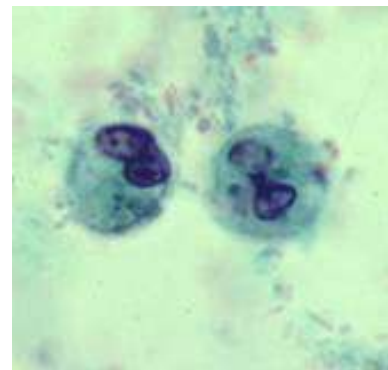
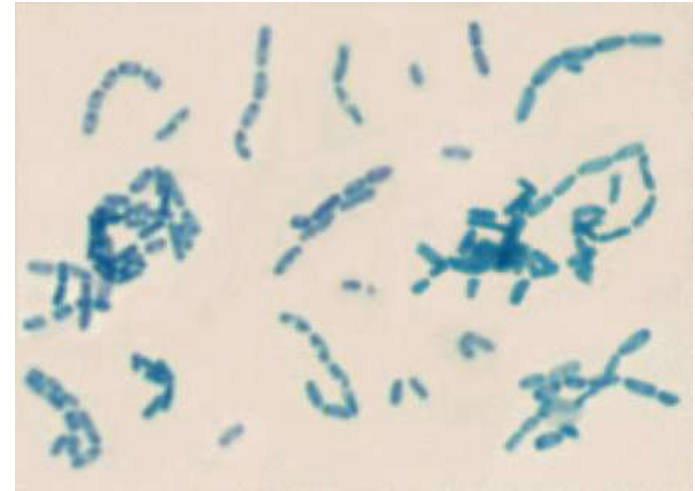


- Για μύκητες σε ιστούς

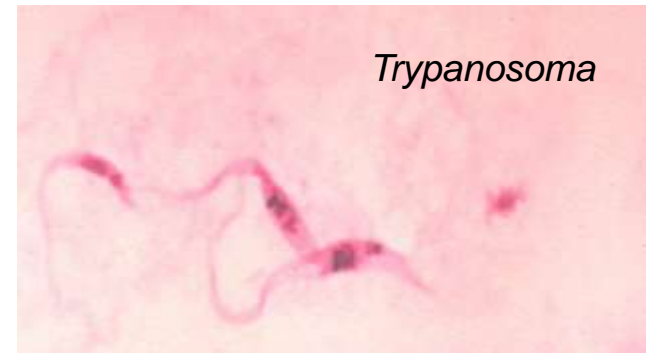
- Χρώση Periodic acid-Schiff



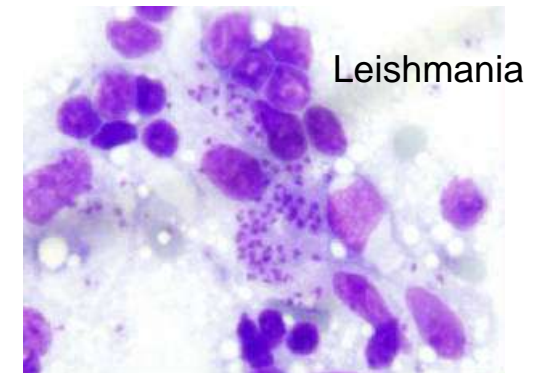
- Άμεση χρώση ENY για βακτήρια και αμοιβάδες, *Yersinia pestis* σε ιστούς
  - Χρώση Wayson (τροποποίηση του κυανού του μεθυλενίου)
- Τρίχρωμη χρώση για εντερικά παράσιτα
  - Χρώση Gomori-Wheatley, Weber-Green, Ryan-Blue



- Χρώση για παράσιτα του αίματος: πλασμώδια, μπαμπέσιες, τρυπανοσώματα, λεισμάνιες, μικροφιλάριες



- *Histoplasma capsulatum*
- *Pneumocystis jirovecii*



- Για κυτταρικά ή ενδοπυρηνικά έγκλειστα ιών

➤ Χρώση Giemsa

- Το πρωτόπλασμα των πρωτοζώων χρωματίζεται γαλάζιο, ενώ ο πυρήνας κόκκινος



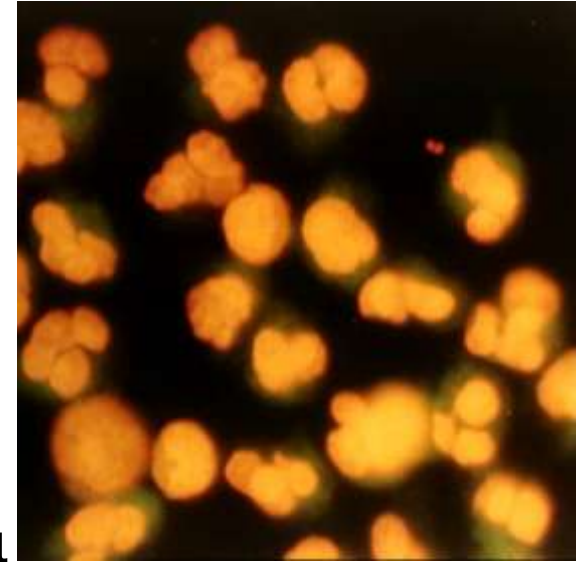
# Χρώσεις μικροβίων

- Απλές
- Σύνθετες
- Ειδικές
- Χρώσεις με φθοριοχρώματα

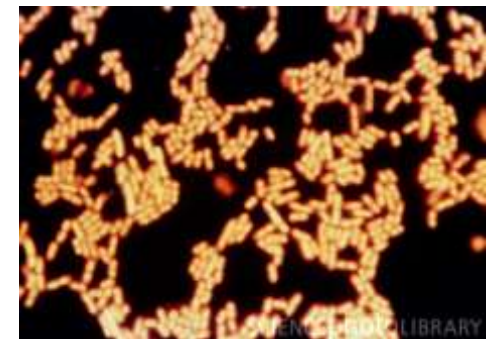
# Φθορίζουσες χρώσεις

## Acridine Orange

- Αντιδρά με το DNA και το RNA των μικροοργανισμών
- Ανιχνεύονται χαμηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων  $10^3$ – $10^4$  cfu/ml
- Άμεσο παρασκεύασμα από βιολογικά υγρά όπου το μικροβιακό φορτίο είναι χαμηλό ή σε περιπτώσεις όπου οι μικροοργανισμοί μπορεί να ναι εγκλωβισμένοι μέσα σε στρώμα κατεστραμμένων ιστών
- Μικροσκόπηση με UV



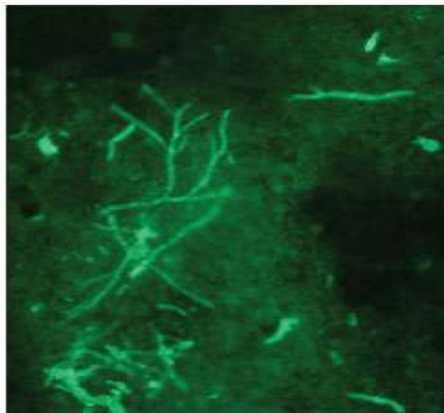
*S. aureus*



*Salmonella typhi*

# Χρώση Calcofluor-white

- Χρώση για μύκητες, υφές, ψευδοϋφές σε ιστούς, σε λέπια δέρματος, σε βλεννογόνους
- Μικροσκόπηση με UV
- Ανάλογα με το μήκος κύματος χρωματίζονται λαμπερά πράσινα ή γαλάζια
- Υπερέχει της χρώσης λακτοφαινόλης



*Aspergillus sp.*



*Candida sp.*



# Χρώση αυραμίνης-ροδαμίνης

- Συνδέεται με το μυκολικό οξύ του τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων



*Mycobacterium tuberculosis*

# Κλινικά δείγματα Διαγνωστικές εφαρμογές

Δείγματα από το ανώτερο αναπνευστικό

Νωπό παρασκεύασμα με φ.ο.

Χρώση Gram:

Gram (+) κόκκοι,

Gram (+) βακτήρια, κινέζικα γράμματα

Gram (-) βακτήρια

Χρώση με κυανό του μεθυλενίου:

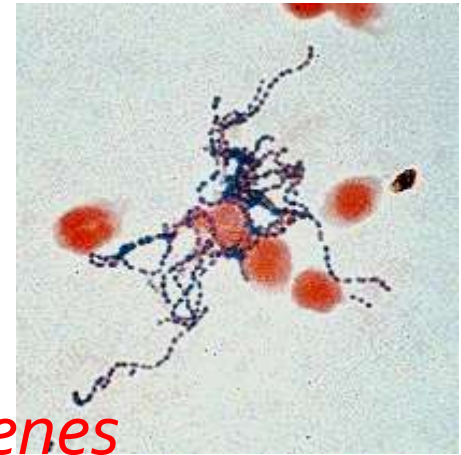
βακτήρια με μεταχρωματικά κοκκία

Χρώση κατά Gram:

Gram (+) κόκκοι



*S. pyogenes*



Gram (+) βακτήρια  
κινέζικα γράμματα

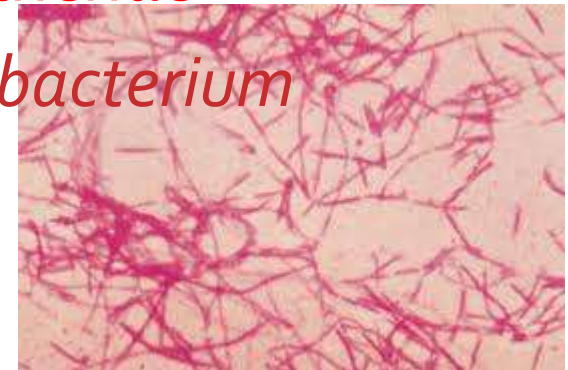


*Corynebacterium  
diphtheriae*

Gram (-) βακτήρια



*Fusobacterium*

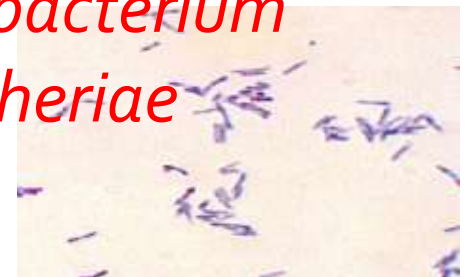


Χρώση με κυανό του  
μεθυλενίου:

βακτήρια με  
μεταχρωματικά  
κοκκία



*Corynebacterium  
diphtheriae*



# Δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις )

Νωπό παρασκεύασμα με φ.ο.

Χρώση κατά Gram:  
καταλληλότητα του  
δείγματος κατά Bartlett και  
κατά Murray Washington

Gram (+) κόκκοι



*S. pyogenes, S. aureus, S. pneumoniae*

Χρώση Giemsa:



Υφές μυκήτων

Χρώση Calcofluor-white:

Οξεάντοχη χρώση



Οξεάντοχα βακτήρια

## Βαθμολόγηση κατά Bartlett

Πολυμ/να		Επιθήλια	
>25	+2	10-25	-1
10-25	+1	>25	-2
<10	0		
Βλέννη	+1		

# Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Χρώση κατά Gram

Gram (+) διπλόκοκκοι

Gram (-) διπλόκοκκοι

Gram (-) βακτήρια με πολυμορφισμό

Gram (+) βακτήρια κινητά

Χρώση με κυανό του μεθυλενίου

Χρώση ακριδίνης

Αντίδραση εξοίδησης ελύτρου

Χρώση με σινική μελάνη ή νιγροσίνη

## Χρώση κατά Gram

Gram (+) διπλόκοκκοι → *S. pneumoniae*

Gram (-) διπλόκοκκοι → *N. meningitidis*

Gram (-) βακτήρια με  
πολυμορφισμό → *H. influenzae*

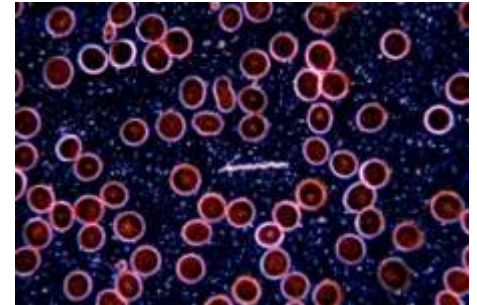
Gram (+) βακτήρια → *Listeria sp.*

Αντίδραση εξοίδησης  
ελύτρου → Οροτυπία *S. pneumoniae*  
*H. influenzae*

Χρώση με σινική μελάνη  
ή νιγροσίνη → *Cryptococcus neoformans*

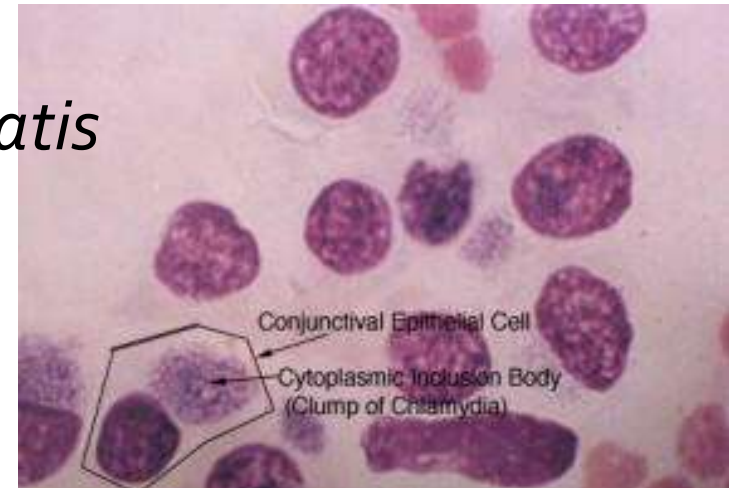
# Αίμα

- Χρώση κατά Gram
  - διάφοροι τύποι βακτηρίων
  - υφές μυκήτων
- Σκοτεινό οπτικό πεδίο
  - σπειροχέτες: μπορέλλια
- Χρώση Giemsa
  - παράσιτα του αίματος: πλασμώδια, μπαμπέσιες, τρυπανοσώματα, λεισμάνιες, μικροφιλάριες



# Οφθαλμικό έκκριμα

- Χρώση κατά Gram
  - διάφοροι τύποι βακτηρίων
- Χρώση Giemsa  
σε ξέσματα κερατοειδούς
  - ενδοκυττάρια περιπυρηνικά συσσωματώματα:  
*Chlamydia trachomatis*





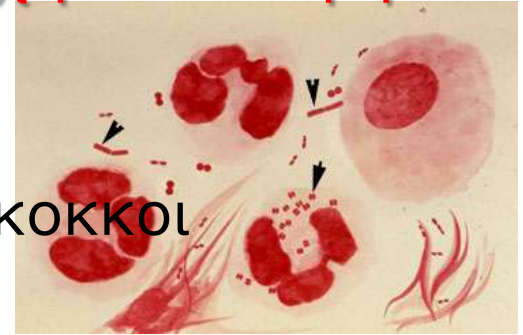
# Ούρα

- Στρώσιμο σταγόνας σε αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς φυγοκέντρωση
- Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου
- 1 μικρ/σμός ανά οπτικό πεδίο (x1000) σε αφυγοκέντρητα ούρα αντιστοιχεί σε  $10^5$ cfu/ml σε καλλιέργεια
- Χρώση κατά Gram (95% ευαισθησία)
  - διάφοροι τύποι βακτηρίων, υφές μυκήτων
- Σκοτεινό οπτικό πεδίο
  - σπειροχέτες: *Leptospira sp.*

## Προστατικό υγρό, ουρηθρικό, τραχηλικό έκκριμα

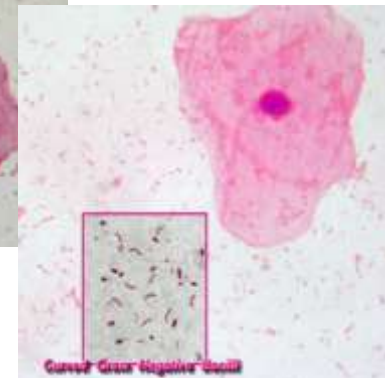
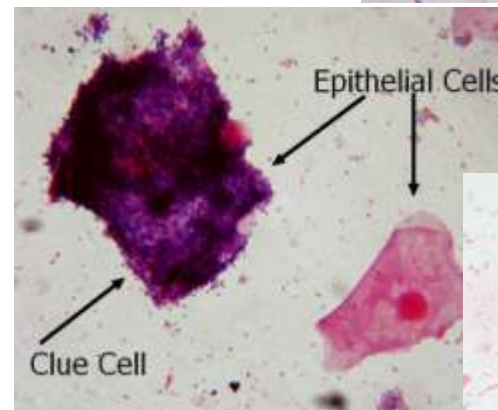
- Χρώση με κυανό του μεθυλενίου
- Χρώση κατά Gram

ενδοκυττάρια Gram (-) διπλόκοκκοι  
*N. gonorrhoea*



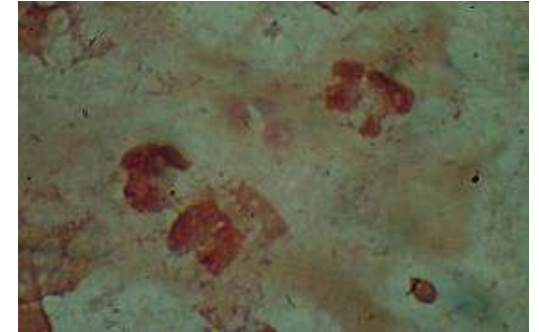
## Κολπικό έκκριμα

- Νωπό παρασκεύασμα  
υφές μυκήτων  
τριχομονάδες
- Χρώση κατά Gram  
clue cells  
υφές μυκήτων  
Gram (-) βακτήρια:  
*Mobiluncus sp.*



# Κόπρανα

- Χρώση κατά Gram
  - διάφοροι τύποι βακτηρίων
  - πολυμορφοπύρρηνα και Gram (+) κόκκοι: εντεροκολίτιδα από *S. aureus*
  - *Campylobacter jejuni*
- Νωπό παρασκεύασμα
  - βακτήρια με έντονη κινητικότητα απουσία πολυμορφοπυρήνων: *Vibrio sp.*
- Νωπό παρασκεύασμα με Lugol
  - παράσιτα



# Τραύμα, απόστημα, ελκωτική βλάβη

## ➤ Χρώση κατά Gram

διάφοροι τύποι βακτηρίων

Gram (+) βακτήρια: *Clostridium perfringens*

## ➤ Νωπό παρασκεύασμα: κοκκία θείου

## ➤ Οξεάντοχη χρώση: *Nocardia, Actinomyces*

## Λέπια δέρματος, νύχια, τρίχες

- Νωπό παρασκεύασμα με διάλυμα ΚΟΗ 10%
- Χρώση λακτοφαινόλης
  - υφές μυκήτων

Ευχαριστώ πολύ

