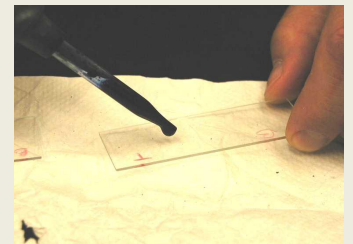
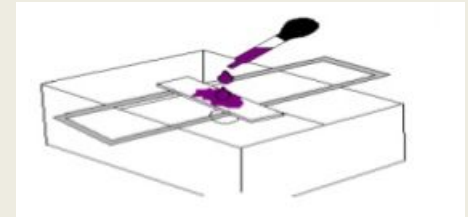


Морфология микроорганизмов. Методы окраски.



- В нативном (естественном) состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, поэтому они невидимы при микроскопическом исследовании.
- Окраска микроорганизмов позволяет изучить морфологические особенности микробов

Основные виды красителей, которые применяются в микробиологической практике:

Дают следующее окрашивание				
красное	голубое (синее)	фиолетовое	желто-коричневое	зеленое
фуксин основной, нейтральный красный, конго красный	метиленовый и толуидиновый синий	генцианвиолет, метиленовый фиолетовый	хризоидин везувин	бриллиантовый зеленый, малахитовый зеленый

Методы окраски

Простой метод

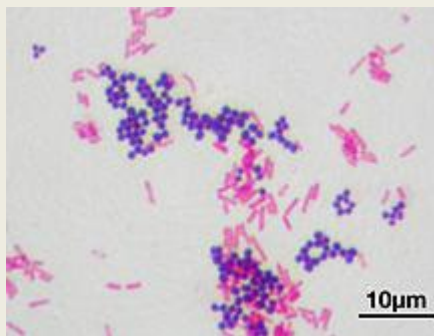
- ☐ 1 этап
- ☐ 1 краситель
- ☐ Можно оценить форму, размеры и взаимное расположение клеток



Стрептококки -это кокки, расположенные цепочками

Сложные методы

- ☐ Несколько этапов
- ☐ 2 красителя
- ☐ Протравы
- ☐ Дифференцирующие вещества
- ☐ Позволяют отличить одну группу бактерий от другой или выявить определенные структуры бактериальной клетки



Грамположительные (фиолетовые) кокки и грамотрицательные (красные) палочки

Методы окраски

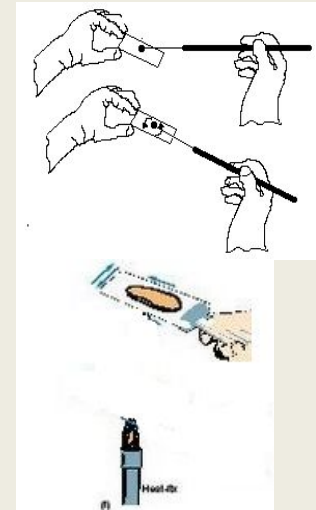
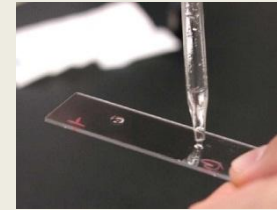
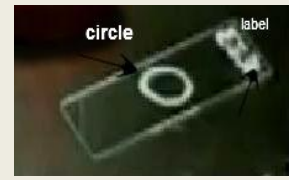
- ❑ **Протравы** – физические и химические факторы, обладающие свойствами повышать окрашиваемость микробов. Уплотняя цитоплазму, они могут делать окраску более прочной, или усиливать красящие свойства красителя, или разрыхлять оболочки клеток, спор, способствуя проникновению краски в клетку.

Протравами обрабатывают мазок:

- ❑ а) перед окрашиванием – воздействуя раствором HCl при окраске спор у бактерий в методе Ожешки,
 - ❑ б) в момент окраски – фенол и высокая температура (подогревание препарата) в методе Циля-Нильсена;
 - ❑ в) после нанесения краски для ее закрепления – раствор Люголя в методе Грама.
-
- ❑ **Дифференцирующие вещества** избирательно обесцвечивают одни виды или структуры бактериальных клеток и не обесцвечивают другие. Например: этиловый спирт в окраске по Граму, серная кислота в методах Циля-Нильсена и Ожешки.

Техника приготовления фиксированного мазка

- ❑ **Фиксированный мазок** – основа большинства методов окраски
- ❑ На обезжиренное предметное стекло наносят бактериальной петлей маленькую каплю исследуемой жидкости; воды или стерильного физиологического раствора и бактериологической петлей переносят в нее небольшое количество исследуемого материала.
- ❑ Полученную суспензию равномерно распределяют тонким слоем на площади 1 – 2 см петлей.
- ❑ Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе. Для ускорения высушивания допускается подогревание мазка в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки.
- ❑ Высушенный мазок фиксируют в пламени горелки.
- ❑ **Фиксация** мазка является обязательной процедурой, в результате которой микробы погибают, прочно прикрепляются к стеклу и значительно лучше воспринимают окраску.



Техника приготовления фиксированного мазка. Простой метод окраски

- **Способы фиксации:**

- обычно применяют фиксацию в пламени горелки (фиксация жаром): предметное стекло в положении мазком вверх 3 раза проводят через пламя горелки.
- применяют также различные жидкие фиксаторы, оказывающие более щадящее действие, например: этиловый или метиловый спирт, ацетон, формалин и др. Существуют также жидкие фиксаторы, представляющие собой смесь нескольких веществ, например, по Никифорову (смесь этилового спирта и эфира 1:1).
- Выбор способа фиксации зависит от окрашиваемого объекта: в жидких фиксаторах фиксируют мазки из крови, гноя, мокроты и т.п. и метода окраски.



Сложные методы окраски

Дифференциальные

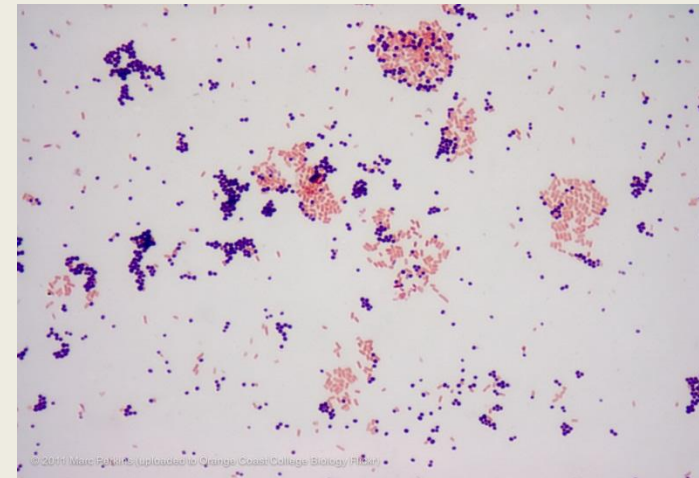
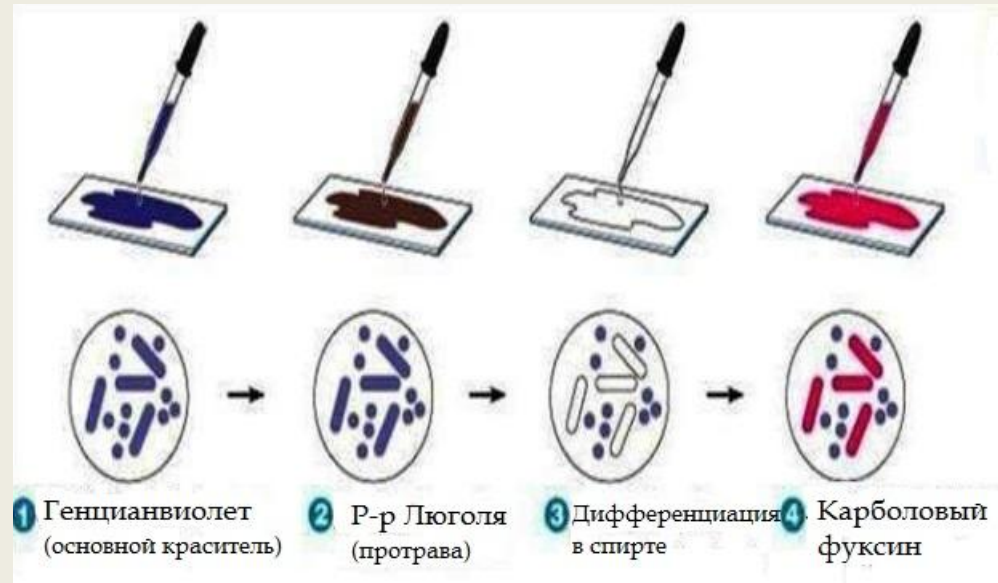
- ❑ Метод Грама – дифференцирует грамположительные и грамотрицательные бактерии – важный таксономический признак
- ❑ Метод Циля-Нильсена – дифференцирует кислотоустойчивые и некислотоустойчивые бактерии – принципиальное значение в диагностике туберкулеза

Выявляющие структуры бактериальной клетки

- ❑ Метод Ожешко – споры
- ❑ Метод Бурри-Гинса – капсула
- ❑ Метод Нейссера – включения волютина
- ❑ Метод Пешкова – клеточная стенка
- ❑ Метод Романовского-Гимзы – **универсальный** – окраска нуклеоида, риккетсий, хламидий, спирохет

Метод Грама

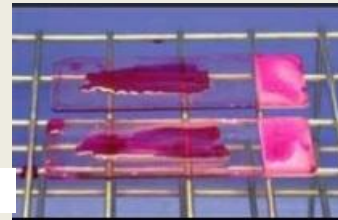
цель метода	Выявление грамположительных и грамотрицательных бактерий
основной краситель	карболовый раствор генцианвиолета
протрава	раствор Люголя (после окрашивания)
дифференцирующее вещество	этанол
дополнительный краситель	разбавленный карболовый раствор фуксина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки до окрашивания
этапы окраски	Окрасить раствором генцианвиолета 1 мин. (или с бумажкой – 3 мин.); Нанести на мазок раствор Люголя – 1 мин.; Промыть в этаноле 30 сек.; Промыть водой; Окрасить раствором фуксина 1 мин. (или с бумажкой – 5 мин.); Промыть водой; Высушить
сущность метода	Генцианвиолет образует комплекс с тейхоевыми кислотами в присутствии Люголя, который задерживается многослойным пептидогликаном у грамположительных бактерий



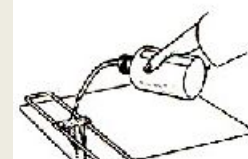
Грамположительные –Staphylococcus- фиолетовые;
Грамотрицательные–E.coli-красные

Метод Циля-Нильсена

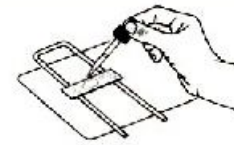
цель метода	Выявление кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий
основной краситель	карболовый раствор фуксина
протрава	карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	Окрашивать карболовым раствором фуксина (фуксин Циля) через фильтровальную бумажку при осторожном нагревании над пламенем спиртовки 3 раза до появления паров белого цвета (1); Промыть в 5% серной кислоте; Промыть водой; Окрасить раствором метиленового синего 1 мин.; Промыть водой; Высушить
сущность метода	При частичном гидролизе клеточной стенки фуксин взаимодействует с миколовыми кислотами и образует комплекс в присутствии фенола



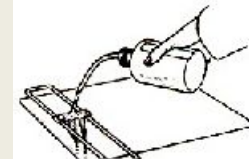
2 дифференциация в серной кислоте 20 сек.



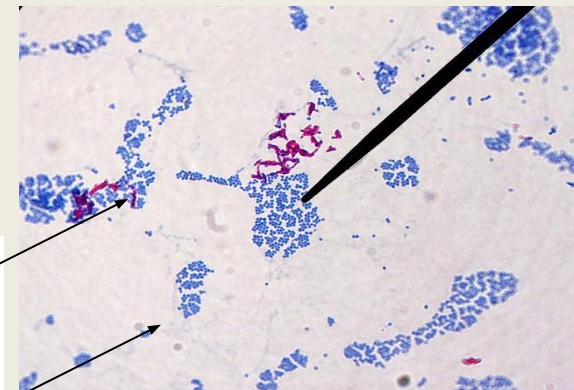
3 Промывка водой



4 окрашивание метиленовым синим

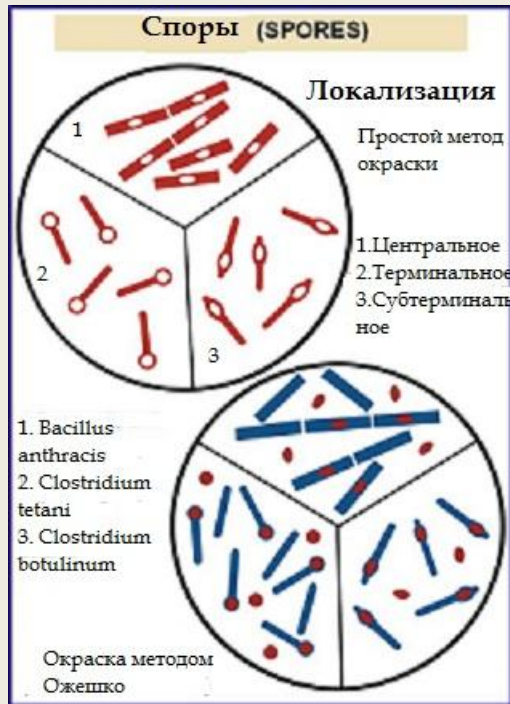


5 Промывка водой

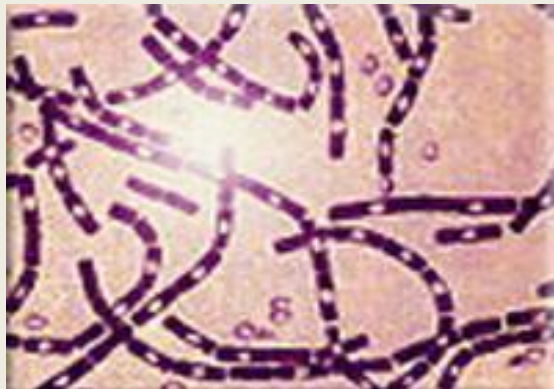


Кислотоустойчивые –
Mycobacterium-
красные;
некислотоустойчивые –
Staphylococcus-синие

Методы выявления спор



- ❑ При простом способе окраски спора не прокрашивается – в этом случае видны только эндоспores как бесцветные образования в клетке
- ❑ Эндоспores в теле клетки может располагаться:
 - 1. центрально — возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis*;
 - 2. терминально — на конце палочки (возбудитель столбняка *Clostridium Tetani*);
 - 3. субтерминально — ближе к концу (возбудитель ботулизма, *Clostridium botulinum*).
- ❑ Способность бактерий образовывать споры, различающиеся по форме, размерам и локализации в клетке, является таксономическим признаком, который используется для их дифференцировки



1. Bacillus anthracis



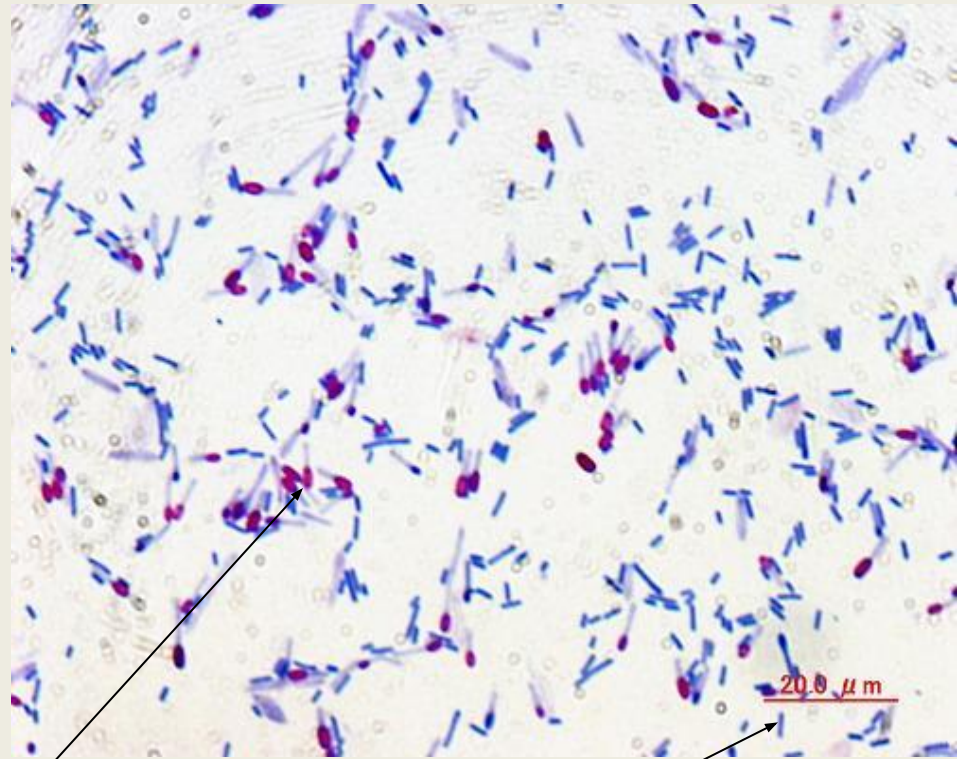
2. Clostridium Tetani



3. Clostridium Botulinum

Методы выявления спор. Метод Ожешко

цель метода	Выявление спор у бактерий
основной краситель	фуксин Циля
протрава	соляная кислота (до окрашивания), карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	На высушенный мазок наложить фильтровальную бумажку, налить 0,5% раствор соляной кислоты и нагревать над пламенем спиртовки до появления пара 3 раза; Далее окрашивать по Цилю-Нильсену.
сущность метода	Внутренние оболочки споры содержат большое количество липидов, которые придают ей свойство кислотоустойчивости

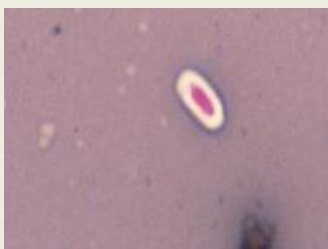


Споры малиновые, видны как эндоспоры внутри вегетативных клеток, так и отдельные споры

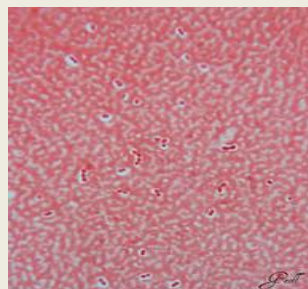
Вегетативные клетки синие

Методы выявления капсул

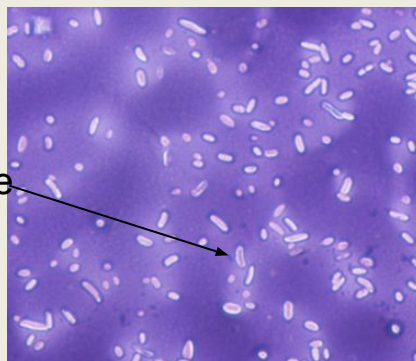
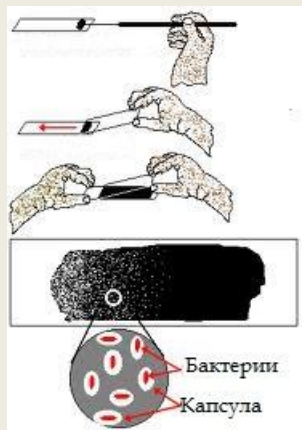
	метод Бурри-Гинса (цитохимический)
цель метода	Выявление капсулы у бактерий в чистой культуре
основной краситель	не окрашивается, применяется оттеняющее вещество - тушь
протрава	-
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	карболовый раствор фуксина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки (в этаноле) до окрашивания
этапы окраски	В каплю туши добавить каплю жидкости с микроорганизмами и растереть тонким слоем как мазок крови; Высушить и зафиксировать; Окрасить фуксином Циля 1 мин.; Высушить
сущность метода	Капсула не окрашивается, задерживает тушь на поверхности, а фуксин окрашивает бактериальную клетку



Метод Бурри-Гинса: на фоне туши видны красные палочки, окруженные бесцветной капсулой



Str.pneumoniae
Простой метод (фуксин)



- Капсулы имеют консистенцию геля, плохо удерживают краситель, и для их выявления чаще всего применяют методы негативного контрастирования
- Капсула выявляется при любом методе окраски в виде неокрашенной зоны между окрашенными телом бактерий и субстратом.
- При простом методе и методе Грама достаточно не промывать мазок на последнем этапе окраски



Грамположительные палочки рода Bacillus
Окраска по Граму

Включения волютина

	метод Нейссера (цитохимический)
цель метода	Выявление включений - зёрен волютина
основной краситель	раствор уксуснокислой синьки
протрава	раствор Люголя
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	раствор везувина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки до окрашивания
этапы окраски	Окрасить уксуснокислой синькой 1 мин.; Промыть водой; Обработать раствором Люголя 30 сек.; Окрасить везувином 30 сек.; Промыть водой Высушить
сущность метода	Включения волютина содержат полифосфаты и имеют слабощелочной pH и окрашиваются синькой, которая закрепляется Люголем, цитоплазма имеет кислый pH и окрашивается везувином

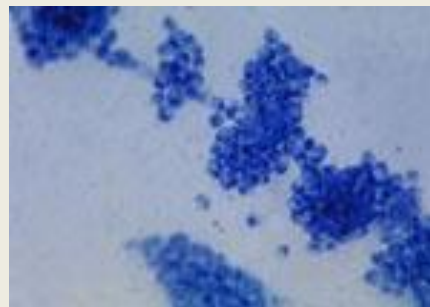
Включения волютина постоянно имеют возбудитель дифтерии-*Corynebacterium diphtheriae*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, что является таксономическим признаком

Метод Леффлера (простой метод)

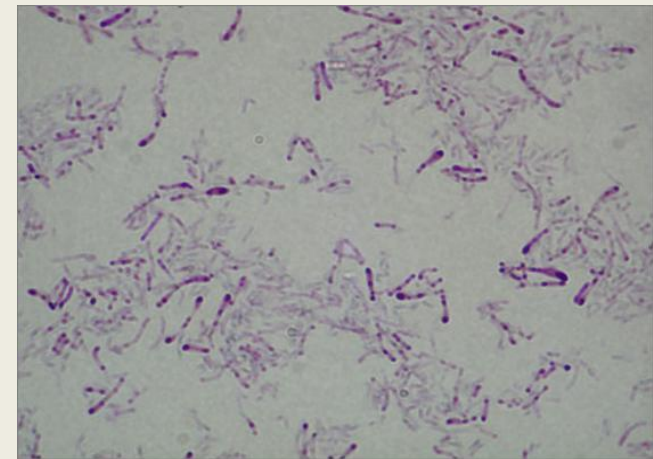
- ❑ Для окраски используют щелочной р-р метиленового синего, который наносят на 3 - 5 мин на фиксированный мазок, после чего смывают водой, мазок высушивают и микроскопируют.
- ❑ Протоплазма бактерий окрашивается в голубой цвет, волютиновые зерна - в темно-синий.



C. diphtheriae окраска по Нейссеру



Candida albicans окраска по Леффлеру: в голубой цитоплазме видны глыбки волютина

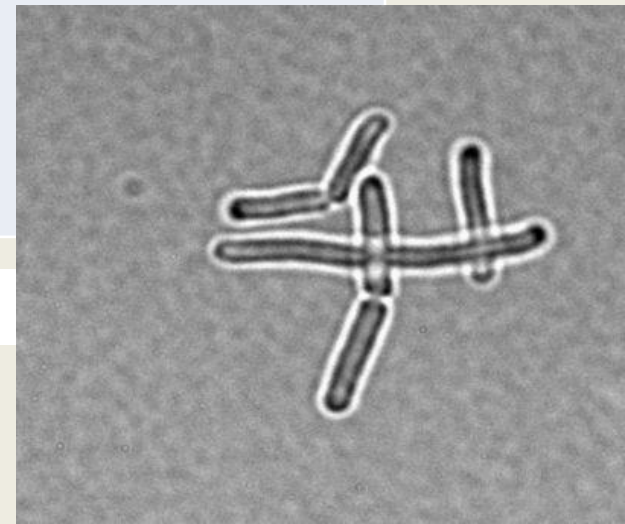


C. diphtheriae окраска по Леффлеру: на полюсах палочек утолщения – зерна волютина

Окраска клеточной стенки по Пешкову

	метод Пешкова (цитохимический)
цель метода	Выявление клеточной стенки бактерий
основной краситель	водный раствор фуксина
протрава	раствор танина
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	-
способ фиксации препарата-мазка	в жидкости Карнуа 15 мин. перед окрашиванием и промывают водой
этапы окраски	Мазок протравливать в 10% водном растворе танина 6-8 мин.; Промыть водой; Окрашивать водным раствором фуксина 30-60 сек.; Высушить
сущность метода	Танин уплотняет клеточную стенку бактерий, и большая часть фуксина задерживается в ней
микроскопическая картина (рисунок с пояснением)	КС –красная; цитоплазма -розовая

Bacillus cereus окраска по Пешкову: клеточная стенка окрашивается более интенсивно



Окраска нуклеоида по Романовскому-Гимзе

	метод Романовского-Гимзы (универсальный)
цель метода	Дифференциальное окрашивание отдельных групп м/о и выявление нуклеоида
основной краситель	краситель Романовского-Гимзы (азур, эозин, метиленовый синий)
протрава	соляная кислота
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	-
способ фиксации препарата-мазка	в жидкости Карнуа 15 мин. перед окрашиванием
этапы окраски	Провести кислотный гидролиз в растворе соляной кислоты при нагревании; Промыть водой; Окрашивают краской Романовского-Гимзы 40-60 мин.; Промыть водой; Высушить
сущность метода	Азур и метиленовый синий окрашивают участки клетки со слабощелочным pH, эозин с кислым



- ❑ *Bacillus cereus* окраска по Романовскому-Гимзе: цитоплазма розовая, нуклеоиды – фиолетовые
- ❑ Поскольку деление цитоплазмы происходит несинхронно с репликацией, в растущей культуре в одной клетке видны несколько нуклеоидов.