

Κεφάλαιο 13

Παρασκευή Επιχρισμάτων

13.1 Ορισμός - Διάκριση

Επιχρίσματα γενικά ονομάζουμε την επίστρωση και καθήλωση βιολογικών υλικών ή μικροβίων επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

Τα μικροβιολογικά παρασκευάσματα διακρίνονται σε δύο είδη: α) τα νωπά και β) τα ξηρά.

Αυτά με την σειρά τους διακρίνονται σε άμεσα και έμμεσα, ανάλογα με την προέλευση της πηγής από όπου αντλείται το παθογόνο μικρόβιο. Εάν αυτό προέρχεται απευθείας από περιοχή του οργανισμού, τότε χαρακτηρίζεται σαν άμεσο. Όταν όμως το μικρόβιο προέρχεται από αποικία του καλλιεργηθέντος παθολογικού εκκρίματος μέσα σε θρεπτικό υλικό, τότε χαρακτηρίζεται σαν έμμεσο. Επομένως τόσο τα νωπά όσο και τα ξηρά παρασκευάσματα είναι δυνατόν να είναι είτε άμεσα είτε έμμεσα.

I. Παρασκευή άμεσου ή έμμεσου νωπού παρασκευάσματος.

Απαιτούμενα σκεύη και υλικά.

α) Αντικειμενοφόρες πλάκες.

β) Καλυπτρίδες.

γ) Φυσιολογικός ορός ή απεσταγμένο νερό.

δ) Κρικοφόροι ή βαμβakoφόροι στυλεοί.

ε) Λύχνος Bunsen.

στ) Δείγμα προς εξέταση.

ζ) Αποικίες καλλιεργημάτων.

13.2 Νωπά επιχρίσματα

Στάδια παρασκευής.

Κατά την παρασκευή του άμεσου νωπού παρασκευάσματος, όλες μας οι κινήσεις γίνονται κοντά σε φλόγα και είναι γρήγορες, σταθερές και συγχρονισμένες, ώστε να αποφεύγεται επιμόλυνση του υλικού (εκκρίματος) με τα μικρόβια του περιβάλλοντος.

Βήμα 1ο

Στο κέντρο μιας καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετούμε μια σταγόνα απεσταγμένου νερού ή φυσιολογικού ορού με μια πιπέτα Pasteur.

Βήμα 2ο

Στο εργαστήριο έχει φθάσει το δείγμα του ασθενούς με βαμβakoφόρο

στυλεό κλεισμένο σε αποστειρωμένο και πωματισμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Εκπωματίζουμε τον σωλήνα και με το στόμιό του κοντά στην φλόγα ανασύρουμε από το εσωτερικό του τον βαμβακοφόρο στυλεό. Στην συνέχεια και αφού προηγουμένως έχουμε κάψει ένα κρικοφόρο στυλεό στην φλόγα, παίρνουμε μέσω αυτού, δείγμα εκκρίματος από τον βαμβακοφόρο στυλεό, σύροντας τον κρικοφόρο επάνω στην περιοχή του βαμβακοφόρου, όπου έχει επικαθήσει το έκκριμα. Παράλληλα τοποθετούμε τον βαμβακοφόρο στυλεό μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα, καίμε το στόμιο του σωλήνα, τον πωματίζουμε και τον αφήνουμε σε ένα στατώ.

Βήμα 3ο

Με τον κρικοφόρο στυλεό ανά χείρας, επάνω στον οποίο έχει επικαθήσει το έκκριμα του ασθενούς, κάνουμε μικρές και σταθερές κινήσεις μέσα στη σταγόνα του απεσταγμένου νερού ή του φυσιολογικού ορού της αντικειμενοφόρου πλάκας, που εξ αρχής είχαμε προετοιμάσει. Στην συνέχεια και αφού διαλυθεί το δείγμα μέσα στη σταγόνα, έχοντας δημιουργηθεί ένα εναιώρημα μικροβίων, καλύπτουμε αυτό με μία καλυπτρίδα.

Βήμα 4ο

Τώρα είμαστε έτοιμοι να μικροσκοπήσουμε το παρασκεύασμα που μόλις φτιάξαμε. Χρησιμοποιούμε τον 10X ή 40X προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου, έχοντας χαμηλό φωτισμό, με το διάφραγμα σχεδόν κλειστό, για να δημιουργήσουμε τις κατάλληλες συνθήκες στο οπτικό μας πεδίο.

Μελέτη - Αποτελέσματα.

Η σκοπιμότητα παρασκευής των άμεσων νωπών παρασκευασμάτων είναι:

- α)** Να ελέγξουμε αν στο δείγμα του εξεταζόμενου υπάρχουν π.χ. υφές και σπόρια μυκήτων ή άλλοι μικροοργανισμοί..
- β)** Να διαπιστώσουμε την ύπαρξη ή μη πυοσφαιρίων (εκφυλισμένες μορφές λευκοκυττάρων) μέσα στο παρασκεύασμα.
- γ)** Να ελέγξουμε αν το μικρόβιο του παθολογικού μας δείγματος είναι κινητό ή ακίνητο (π.χ. αν το εξεταζόμενο μικρόβιο είναι η τριχομονάδα, θα την δούμε στο οπτικό μας πεδίο να κινείται με το μαστίγιό της).

II. Παρασκευή έμμεσου νωπού παρασκευάσματος.

Η παρασκευή του έμμεσου νωπού παρασκευάσματος είναι καθ'όλα όμοια με αυτή του άμεσου, με μόνη διαφορά ότι το δείγμα του εξεταζόμενου δεν προέρχεται από περιοχή του οργανισμού του η οποία νοσεί, αλλά από ήδη

αναπτυχθείσες αποικίες σε θρεπτικό υγρό, όπου καλλιεργήθηκε. Το έμμεσο νωπό παρασκεύασμα δεν γίνεται κατά τις διαδικασίες ταυτοποίησης ενός μικροβίου, διότι τις πληροφορίες που θα μας έδινε τις έχουμε ήδη πάρει από το άμεσο νωπό παρασκεύασμα.

13.3 Ξηρά επιχρίσματα

Στάδια παρασκευής.

Απαιτούμενα σκεύη και υλικά:

- α)** Αντικειμενοφόρες πλάκες.
- β)** Καλυπτρίδες.
- γ)** Φυσιολογικός ορός ή απεσταγμένο νερό.
- δ)** Κρικοφόροι ή βαμβακοφόροι στυλεοί.
- ε)** Λύχνοι Bunsen.
- στ)** Δείγμα προς εξέταση.
- ζ)** Αποικίες καλλιεργημάτων.

Το 1ο και το 2ο βήμα για την παρασκευή άμεσου ξηρού παρασκευάσματος είναι καθ' όλα όμοια με αυτά τα βήματα που ακολουθήσαμε για την παρασκευή του άμεσου νωπού παρασκευάσματος.

Βήμα 3ο

Με τον κρικοφόρο στυλεό, στον οποίο έχει επικαθήσει το δείγμα του εξεταζόμενου, κάνουμε μικρές και σταθερές κινήσεις μέσα στην σταγόνα του φυσιολογικού ορού ή απεσταγμένου νερού της αντικειμενοφόρου πλάκας, που εξ αρχής έχουμε προετοιμάσει. Στην συνέχεια και αφού έχουμε δημιουργήσει ένα εναιώρημα των μικροβίων μέσα στην σταγόνα, με τον κρικοφόρο στυλεό, απλώνουμε τη σταγόνα μας κατά μήκος και κατά πλάτος της αντικειμενοφόρου πλάκας κάνοντας ομόκεντρους κύκλους, προσέχοντας να μην εξαπλωθεί το παρασκεύασμά μέχρι τις άκρες του περιγράμματος της πλάκας.

Βήμα 4ο

Τοποθετούμε στην συνέχεια την πλάκα μας με το παρασκεύασμα επάνω σε ειδικά στατώ, για να στεγνώσει.

Βήμα 5ο

Αφού περιμένουμε 5-10 min για το στέγνωμα της πλάκας, στην συνέχεια επακολουθεί το στάδιο της μονιμοποίησης του παρασκευάσματος. Κατά το στάδιο αυτό ενεργούμε ως εξής: Την περνάμε πολύ γρήγορα πάνω από φλόγα,

κρατώντας την με μια ξύλινη λαβίδα, από μία έως τέσσερις φορές, έτσι ώστε να δώσουμε την ευκαιρία στα μικρόβια να καθηλωθούν επάνω στην επιφάνεια της πλάκας και να μην είναι εύκολο να αποκολληθούν ή να παραμορφωθούν κατά τη διαδικασία της χρώσης του παρασκευάσματος (Εικ. 13.1).

Βήμα 6ο

Μετά τη μονιμοποίηση των μικροβίων επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα επακολουθεί το στάδιο της χρώσης. Οι χρωστικές που θα επιλέξουμε για να κάνουμε τη βαφή των μικροβίων εξαρτώνται από την κατεύθυνση που θα μας έχει δώσει ο γιατρός σχετικά με τη λοίμωξη του ασθενούς (αν υποπτεύεται δηλαδή ότι αυτή μπορεί να προέρχεται από κόκκους ή από βακτηρίδια είτε από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης κ.λ.π.). Γενικά, η επιλογή μας κατευθύνεται σε μια χρώση, η οποία μας δίνει πολλές πληροφορίες για το υπό αναζήτηση μικρόβιο.

Βήμα 7ο

Χρώση

Βήμα 8ο

Μετά το πέρας του βαψίματος του παρασκευάσμάτος μας επακολουθεί το στάδιο της μικροσκόπησης. Η μικροσκόπηση των ξηρών παρασκευασμάτων γενικά γίνεται με καταδυτικό φακό, τον 100X έχοντας τελειώς ανοικτό το διάφραγμα και την ένταση του φωτός, έτσι ώστε να επικρατεί άπλετος φωτισμός στο οπτικό μας πεδίο. Πριν ξεκινήσει η μικροσκόπηση του παρασκευάσματος, τοποθετούμε στο κέντρο αυτού μια σταγόνα κεδρέλαιου, του οποίου ο ρόλος είναι να βελτιώσει τις συνθήκες μικροσκόπησης του αντικειμένου μας.

Μελέτη - Αποτελέσματα.

Η σκοπιμότητα παρασκευής των εν λόγω παρασκευασμάτων είναι:

Με την μικροσκοπική εξέταση του άμεσου ξηρού παρασκευάσματος μπορούμε να βρούμε μικρόβια από την νοσούσα περιοχή του οργανισμού του ασθενούς, τα οποία θα μας βοηθήσουν και θα μας κατευθύνουν το στάδιο της καλλιέργειας. Δηλαδή θα μας ωθήσουν στο να επιλέξουμε τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, μέσα στα οποία θα κάνουμε την σπορά του υπεύθυνου για την λοίμωξη του ασθενούς μας μικροβίου.

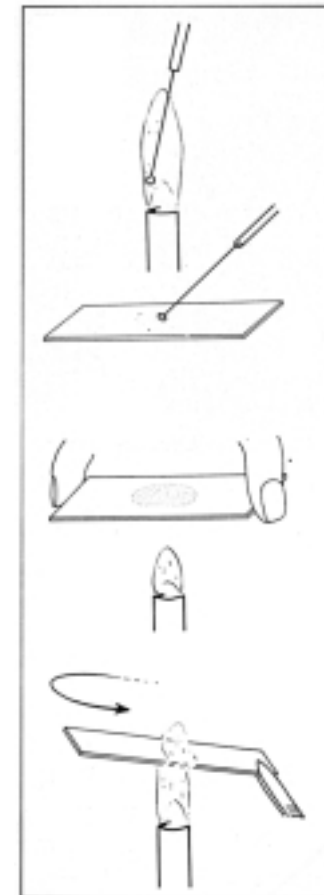
III Παρασκευή έμμεσου ξηρού παρασκευάσματος.

Η παρασκευή του έμμεσου ξηρού παρασκευάσματος είναι καθ'όλα όμοια με αυτή του άμεσου ξηρού, με μόνη διαφορά την προέλευση του δείγματος. Θα

λάβουμε δηλαδή μικρή ποσότητα αποικίας από το θρεπτικό υλικό, όπου καλλιιεργήθηκε το δείγμα του εξεταζόμενου.

Μελέτη - Αποτελέσματα.

Τα εν λόγω παρασκευάσματα γίνονται όταν η λοίμωξη αφορά περιοχές του ανθρώπινου οργανισμού, οι οποίες φέρουν εκτός του παθογόνου μικροβίου, που προκάλεσε τη λοίμωξη και μικρόβια λόγω ύπαρξης φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας. Από τις αποικίες των διαφόρων ειδών μικροβίων που θα αναπτυχθούν λόγω της καλλιέργειας του παθολογικού εκκρίματος του ασθενούς, θα επιλέξουμε εμείς τις ύποπτες με το πιθανό παθογόνο μικρόβιο και όχι αυτές που θα δώσουν τα μικρόβια της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας. Από αυτές θα κάνουμε τα έμμεσα ξηρά παρασκευάσματά. Έτσι ανάλογα με την εικόνα που θα μας δώσουν αυτά μετά από χρώση Gram θα επιλέξουμε τις βιοχημικές δοκιμασίες στις οποίες θα υποβάλλουμε το υπεύθυνο μικρόβιο για τη λοίμωξη του ασθενούς.



Εικόνα 13.1. Μονιμοποίηση παρασκευάσματος πάνω από φλόγα

Περίληψη

Η μελέτη των νωπών και των ξηρών παρασκευασμάτων βοηθά το έργο της ταυτοποίησης των μικροβίων.

Τα αποτελέσματα της μικροσκοπησης των νωπών παρασκευασμάτων διασφαλίζουν την ύπαρξη πυοσφαιρίων, μυκήτων, παρασίτων κτλ μέσα στο έκκριμα καθώς επίσης και την κινητική ή μη ικανότητα των μικροβίων. Τα ξηρά παρασκευάσματα χρησιμεύουν στην επιλογή των κατάλληλων θρεπτικών υλικών για τη σπορά του κλινικού δείγματος, στην υποβολή του μικροβίου στον ενδεδειγμένο βιοχημικό έλεγχο, προκειμένου να επιτευχθεί η τυποποίησή του.

Οι τεχνικές των χρώσεων που χρησιμοποιούμε μέσα στο μικροβιολογικό εργαστήριο είναι πολλές, επικρατέστερη όμως όλων είναι η τεχνική της χρώσης Gram. Η χρώση Gram διαχωρίζει τα βακτήρια σε δύο μεγάλες ομάδες:

- A.** Τα Gram+ θετικά (βάφονται μπλε)
- B.** Τα Gram- αρνητικά (βάφονται κόκκινα).

Ερωτήσεις

Τεχνική παρασκευής και χρησιμότητα νωπών επιχρισμάτων.

1. Τεχνική παρασκευής και χρησιμότητα ξηρών κεχρωσμένων κατά Gram
2. επιχρισμάτων.
Τεχνική παρασκευής και χρησιμότητα ξηρών κεχρωσμένων κατά Ziehl
3. Neelsen επιχρισμάτων.
Τεχνική παρασκευής και χρησιμότητα ξηρών κεχρωσμένων κατά Albert
4. επιχρισμάτων.