

Κεφάλαιο 14

Χρώσεις Επιχρισμάτων

14.1 Γενικά

Χρώσεις και χρωστικές

Τα κύτταρα των βακτηρίων, οι σπόροι, οι βλεφαρίδες και το έλυτρο τους χρωματίζονται με διάφορες χρωστικές. Τις πιο πολλές φορές η χρώση των παθογόνων βακτηρίων με τις χρωστικές είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να μελετηθούν στο μικροσκόπιο και να ταυτοποιηθούν.

14.2 Διαίρεση των χρωστικών

Φέρονται με τη μορφή σκόνης ή κρυστάλλων και διακρίνονται σε φυσικές και τεχνητές.

Οι *φυσικές χρωστικές* μπορεί να είναι ζωικής ή φυτικής προέλευσης, όπως π.χ. αιματοξυλίνη και χρησιμοποιούνται ελάχιστα στη Μικροβιολογία.

Οι *τεχνητές χρωστικές* χρησιμοποιούνται με τη μορφή αλάτων και διακρίνονται σε βασικές, όξινες και ουδέτερες. Στη Μικροβιολογία χρησιμοποιούνται κυρίως οι βασικές χρωστικές, επειδή το κυτταρόπλασμα των βακτηρίων είναι όξινο από το μεγάλο ποσοστό ριβονουκλεϊνικού οξέος που περιέχει.

Βασικές χρωστικές είναι το κυανό του μεθυλενίου, η βασική φουξίνη, το κρυσταλλικό ιώδες, το ιώδες της γεντιανής, η σαφρανίνη. Οξίνες χρωστικές είναι η ηωσίνη και η όξινη φουξίνη. Ουδέτερες χρωστικές είναι η Giemsa (ηωσίνη + κρυσταλλικό ιώδες).

Οι ουδέτερες χρωστικές προέρχονται από ανάμιξη διαλυμάτων βασικής και όξινης χρωστικής, κάτω από κατάλληλες αναλογίες. Αυτές χρησιμοποιούνται για την χρώση των παρασίτων και του αίματος.

Χρωστικά διαλύματα: Οι χρωστικές χρησιμοποιούνται με τη μορφή διαλυμάτων. Προηγείται η παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων από τα οποία προέρχονται τα υδατικά διαλύματα. Τα μητρικά διαλύματα είναι κεκορεσμένα διαλύματα των χρωστικών σε απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (95%). Από την αραιώση των μητρικών διαλυμάτων με απεσταγμένο νερό παρασκευάζονται τα υδατικά διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την χρώση των βακτηρίων.

14.3 Διαίρεση των χρώσεων

Οι χρώσεις διακρίνονται σε αρνητικές και θετικές.

Αρνητικές είναι οι χρώσεις στις οποίες χρωματίζεται το περιβάλλον του βακτηρίου, ενώ το κύτταρο παραμένει άχρωμο. Για τις αρνητικές χρώσεις

χρησιμοποιούνται διαλύματα σινικής μελάνης και νιγροσίνης. Παράδειγμα μικροβίου που χρωματίζεται με τέτοιου είδους χρώση είναι το τρεπόννημα το ωχρό. Θετικές είναι οι χρώσεις στις οποίες χρωματίζονται τα κύτταρα των βακτηρίων. Διακρίνονται σε απλές και σύνθετες. Οι απλές γίνονται με μία χρωστική ενώ στις σύνθετες χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες χρωστικές. Οι χρώσεις διακρίνονται σε αρνητικές και θετικές.

Αρνητικές είναι οι χρώσεις στις οποίες χρωματίζεται το περιβάλλον του βακτηρίου, ενώ το κύτταρο παραμένει άχρωμο. Για τις αρνητικές χρώσεις χρησιμοποιούνται διαλύματα σινικής μελάνης και νιγροσίνης. Παράδειγμα μικροβίου που χρωματίζεται με τέτοιου είδους χρώση είναι το τρεπόννημα το ωχρό. Θετικές είναι οι χρώσεις στις οποίες χρωματίζονται τα κύτταρα των βακτηρίων. Διακρίνονται σε απλές και σύνθετες. Οι απλές γίνονται με μία χρωστική ενώ στις σύνθετες χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες χρωστικές.

14.4 Τεχνικές χρώσης

Για να γίνει η χρώση των βακτηρίων, αυτά πρέπει να τοποθετηθούν πρώτα επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, δηλαδή να γίνει ένα επίχρισμα του μικροβιολογικού υλικού επάνω σε αυτήν (βλέπε κεφάλαιο άμεσα -έμμεσα παρασκευάσματα).

Τα στάδια που προηγούνται από την τεχνική της χρώσης είναι:

- A. Επίστρωση
- B. Αποξήρανση
- Γ. Μονιμοποίηση.

Τεχνική χρώσης μπλε του μεθυλενίου.

Πρόκειται για μια απλή θετική χρώση, με την οποία βάφονται όλα ανεξαιρέτως τα βακτήρια. Η χρωστική, που χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της χρώσης αυτής είναι το μπλε του μεθυλενίου.

Τα στάδια της χρώσης μπλε του μεθυλενίου είναι τα ακόλουθα:

- α) Καλύπτουμε το παρασκεύασμα με υδατικό διάλυμα της χρωστικής για 1 λεπτό.
- β) Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
- γ) Αφήνουμε το παρασκεύασμα να στεγνώσει ή το ξηραίνουμε μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού. Έτσι είναι έτοιμο για μικροσκόπηση.

Με αυτή τη χρώση χρωματίζονται όλα τα βακτήρια. Αν πρόκειται για σπορογόνο μικρόβιο το μικροβιακό σώμα χρωματίζεται κυανό, ενώ ο σπόρος δεν χρωματίζεται και φαίνεται σαν κενός χώρος, μέσα στο χρωματισμένο μικροβιακό κύτταρο.

Τεχνική χρώσης Gram

Η Gram χρώση είναι μία σύνθετη θετική χρώση που χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλη στη βακτηριολογία. Η περιγραφή κάθε είδους βακτηρίου αρχίζει πάντοτε με τον τρόπο που χρωματίζεται με τη χρώση Gram, δηλαδή αναφέρεται εάν πρόκειται για Gram θετικό ή Gram αρνητικό βακτήριο, γεγονός το οποίο οφείλεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος αυτών. (Εικ. 14.1)

Οι χρωστικές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική της χρώσης Gram είναι:

- 1. Κρυσταλλικό ιώδες (μπλε χρωστική).
- 2. Σαφρανίνη (κόκκινη χρωστική).
- 3. Lugol : Το αντιδραστήριο αυτό αποτελεί διάλυμα 1 gr ιωδίου και 2 gr ιωδιούχου καλίου σε 300 ml απεσταγμένου νερού.
Η σκοπιμότητα της τοποθέτησής του στο παρασκεύασμα αφορά στην κατακράτηση της μπλε χρωστικής από τα βακτηριακά κύτταρα.
- 4. Ισομοριακό μίγμα αιθυλικής αλκοόλης και ακετόνης.

Το αντιδραστήριο αυτό τοποθετείται στο επίχρισμα προκειμένου να αποχρωματίσει από την μπλε χρωστική όσα βακτηριακά κύτταρα δεν έχουν προορισμό να χρωματισθούν από το κρυσταλλικό ιώδες.

Τα στάδια της χρώσης Gram είναι:

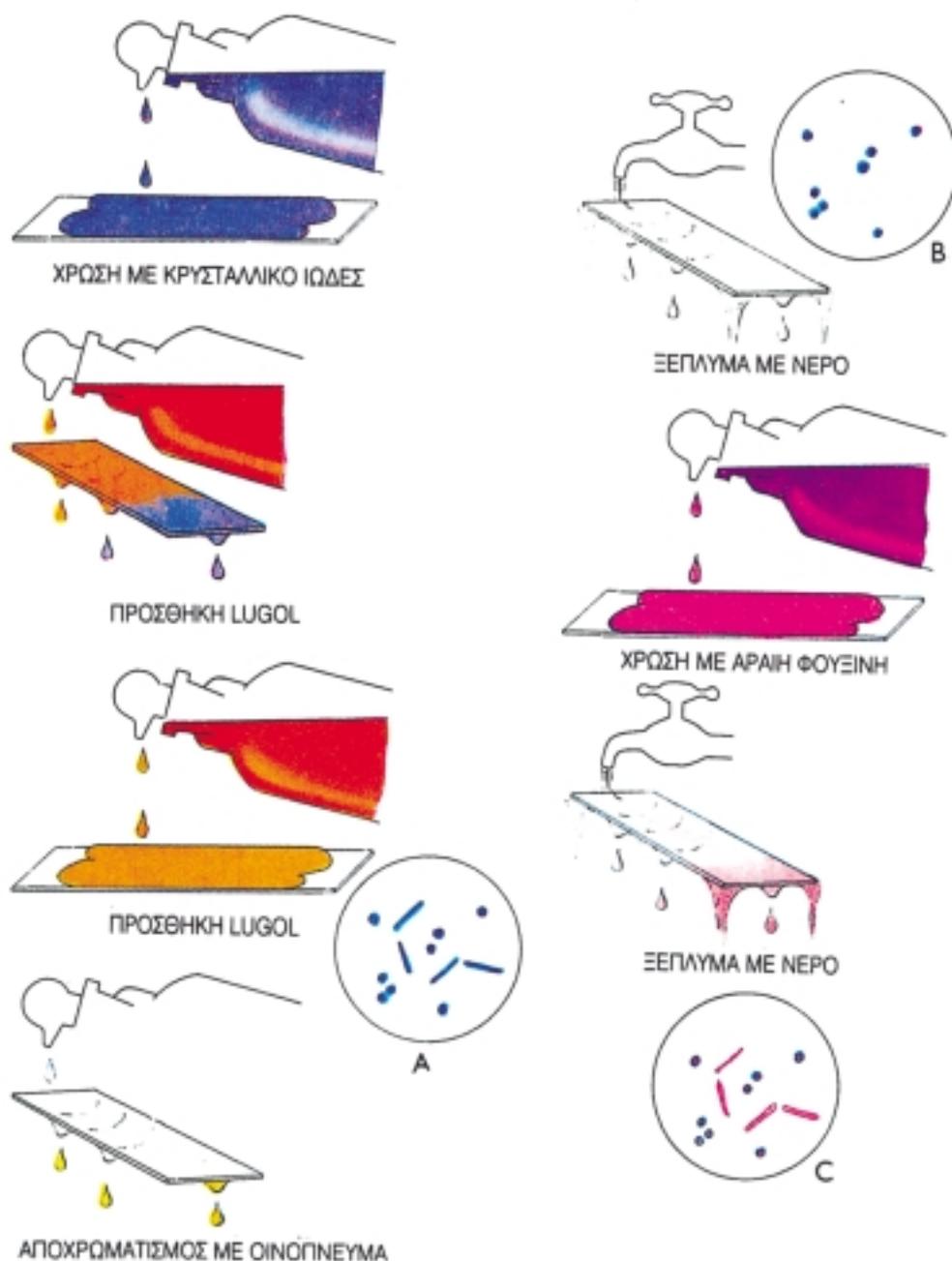
- α) Καλύπτουμε το παρασκεύασμα με κρυσταλλικό ιώδες για ένα λεπτό.
- β) Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
- γ) Καλύπτουμε με Lugol για ένα λεπτό.
- δ) Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
- ε) Αποχρωματίζουμε με μίγμα αιθυλικής αλκοόλης και ακετόνης.
- στ) Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
- ζ) Καλύπτουμε με Σαφρανίνη για 20 sec έως 40 sec.
- η) Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.

Τα Gram θετικά βακτήρια κατακρατούν την πρώτη χρωστική και εμφανίζονται με χρώμα κυανό ενώ τα Gram αρνητικά βακτήρια αποχρωματίζονται με τον οργανικό διαλύτη και χρωματίζονται κόκκινα με τη σαφρανίνη.

Τεχνική της χρώσης Ziehl Neelsen:

Πρόκειται για μια σύνθετη θετική χρώση, η οποία χρησιμοποιείται για τον χρωματισμό οξεάντοχων βακτηρίων, όπως είναι τα Μυκοβακτηρίδια. (Εικ.14.2)
Οι χρωστικές και τα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία της χρώσης Z.N. είναι τα ακόλουθα:

ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM



Εικόνα 14.1. Χρώση κατά Gram

1. Πυκνή φαινικούχος φουξίνη.
2. Κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler.
3. Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη, η οποία περιέχει 3% w/w HCl (οξεισμένη αλκοόλη)

Στάδια της χρώσης Ziehl Neelsen:

α) Αμέσως μετά την παρασκευή και τη μονιμοποίηση του επιχρίσματος, το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της πυκνής φαινικούχος φουξίνης και η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας θερμαίνεται υπεράνω φλόγας μέχρι του σημείου να εμφανισθούν ατμοί, οπότε απομακρύνεται η εστία θέρμανσης.

β) Το διάλυμα της πυκνής φαινικούχος φουξίνης αφήνεται να επιδράσει επί 5 λεπτά

γ) Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με νερό βρύσης.

δ) Το παρασκεύασμα αποχρωματίζεται βαθμιαία με σταγόνες οξεισμένης αλκοόλης, μέχρις ότου εξαφανισθεί το κόκκινο χρώμα του διαλύματος της πυκνής φαινικούχος φουξίνης από την αντικειμενοφόρο πλάκα.

ε) Ξεπλένεται με νερό βρύσης το παρασκεύασμα.

στ) Το επίχρισμα καλύπτεται με το διάλυμα του κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler, το οποίο αφήνεται να δράσει επί 1 λεπτό.

ζ) Ξεπλένεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει.

Με τη χρώση Ziehl Neelsen τα οξεάντοχα βακτήρια χρωματίζονται κόκκινα, ενώ τα άλλα βακτήρια και τα κύτταρα των ιστών χρωματίζονται κυανά.

Σημείωση: Η χρωστική της πυκνής φαινικούχος φουξίνης παρασκευάζεται από την ανάμιξη 10 ml διαλύματος Α και 100 ml διαλύματος Β και διηθείται:

Το διάλυμα Α προκύπτει από την διάλυση 10 gr φουξίνης σε 100 ml αιθυλικής αλκοόλης 95ο. Στη συνέχεια το διάλυμα Α τοποθετείται στους 37οC επί 24 ώρες.

Το διάλυμα Β παρασκευάζεται από την διάλυση 5 gr φαινόλης σε 100 ml απεσταγμένου νερού.

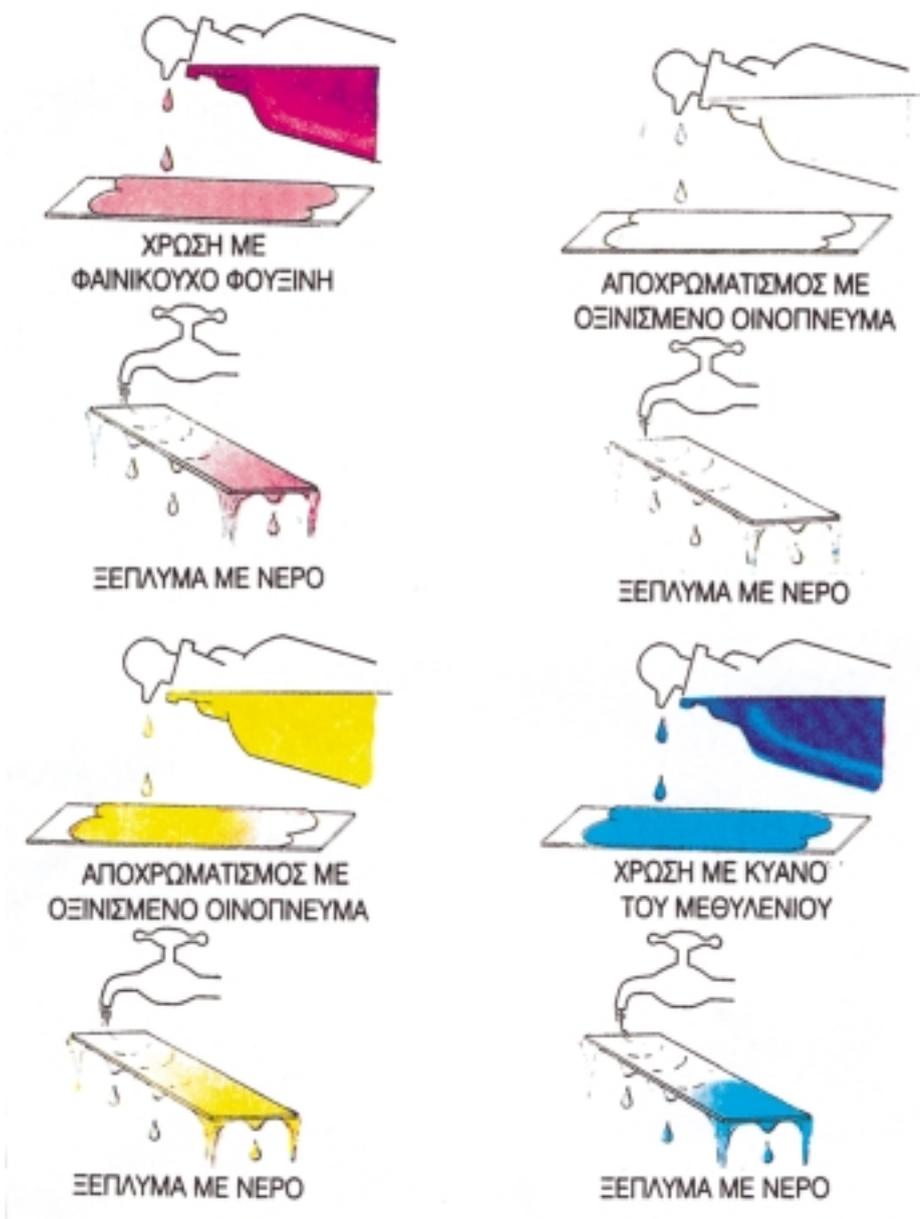
Τεχνική χρώσης Albert

Η χρώση Albert αποτελεί μια σύνθετη θετική χρώση, η οποία κυρίως χρησιμοποιείται για τον χρωματισμό των Κορυνοβακτηριδίων.

Οι χρωστικές και τα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της χρώσης Albert είναι:

1. Το χρωστικό διάλυμα κατά Albert.

ΟΞΕΑΝΤΟΧΗ ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΖΙΕΗΛ - NEELSEN



Εικόνα 14.2. Χρώση κατά Ziehl-Neelsen

2. Το διάλυμα Lugol.

Στάδια της χρώσης Albert:

α) Μετά την παρασκευή και την μονιμοποίηση του επιχρίσματος, το παρασκεύασμα καλύπτεται με το χρωστικό διάλυμα κατά Albert επί 3 - 5 λεπτά.

β) Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με νερό βρύσης και ξηραίνεται μεταξύ φύλλων διηθητικού χάρτου.

γ) Στη συνέχεια, το παρασκεύασμα καλύπτεται με διάλυμα Lugol επί 1 λεπτό.

δ) Ξεπλένεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει.

Με την χρώση Albert το κυτταρόπλασμα των Κορυνοβακτηριδίων χρωματίζεται πράσινο, ενώ τα αλλόχρωμα ή μεταχρωματικά κοκκία χρωματίζονται κυανομέλανα.

Σημείωση : Το χρωστικό διάλυμα κατά Albert παρασκευάζεται ως εξής:

0,2 gr πράσινο του μαλαχίτη και 0,15 gr κυανού της τολουϊδίνης διαλύονται σε 2 ml αιθυλικής αλκοόλης 95ο.

1 ml οξείκου οξέως αναμιγνύεται με 100 ml απεσταγμένου νερού και το διάλυμα αυτό προστίθεται στο μίγμα των χρωστικών. Το χρωστικό πλέον διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 24 ώρες και διηθείται πριν τη χρησιμοποίησή του.

Περίληψη

Στην Ιατρική Μικροβιολογία χρησιμοποιούνται πλήθος τεχνικών χρώσεων, με σκοπό την ταυτοποίηση των παθογόνων μικροβίων.

Μερικές από αυτές τις χρώσεις είναι οι εξής:

A. Η χρώση μπλε του μεθυλενίου, με την οποία χρωματίζονται όλα τα βακτήρια.

B. Η χρώση Gram, με την οποία διακρίνονται τα βακτήρια σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Τα Gram (+)(μπλε) και τα Gram (-) (κόκκινα).

Γ. Η χρώση Ziehl Neelsen, με την οποία χρωματίζονται κόκκινα τα οξεάντοχα βακτήρια (μυκοβακτηρίδια).

Δ. Η χρώση κατά Albert, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τον χρωματισμό των κορυνοβακτηριδίων.

Ερωτήσεις

1. Ποιες κατηγορίες χρωστικών γνωρίζετε;
2. Ποιες κατηγορίες χρώσεων γνωρίζετε;
3. Σε τι διαφέρουν οι χρώσεις από τις χρωστικές;
4. Τεχνική της χρώσης μπλε του μεθυλενίου - Αποτελέσματα.
5. Χρωστικές - Αντιδραστήρια και σκοπιμότητα αυτών στη χρώση Gram.
6. Τεχνική και Αποτελέσματα της χρώσης Gram.
7. Τεχνική και Αποτελέσματα της χρώσης Ziehl Neelsen.
8. Τεχνική και Αποτελέσματα της χρώσης κατά Albert.