

Způsoby barvení bakterií, mikromycet a parazitů.

K základním metodám mikrobiologie patří příprava nativního nebo fixovaného preparátu.

Nativní preparát

Neobarvené nativní preparáty se v bakteriologii příliš nevyužívají. Nativní preparáty slouží hlavně k diagnostice parazitárních a mykotických infekcí. V bakteriologii se nativní preparát využívá například pro pozorování pohybující se *Treponema pallidum* pomocí mikroskopie v zástinu.

Postup přípravy nativního preparátu je jednoduchý. Na podložní sklíčko kápneme kapku fyziologického roztoku, do kterého kličkou vneseme vzorek. Následně to celé přiklopíme krycím sklíčkem (bez bublinek) a pozorujeme mikroskopem.

Fixovaný preparát

K fixaci preparátu dochází před barvením. Na sklíčko kápneme fyziologický roztok a do této kapky přidáme kličkou vzorek. Celé to pak necháme zaschnout. Nakonec připravený vzorek fixujeme pomocí plamene kahanu nebo například metanolem. Účelem fixace je usmrcení bakterií a jejich pevné přichycení ke sklíčku, aby se při následném barvení nesmyly.

Barvení preparátů

Barvení preparátů se provádí po fixaci vzorku. Barvení jednotlivých struktur mikroorganismů nám ulehčuje jejich identifikaci.

Pro bakterie o velikosti několika μm se používá mikroskopie s imerzním objektivem s 1000x zvětšením pozorování. Preparát na sklíčku zakápneme kapkou imerzního oleje, krycí sklíčko se nepoužívá. Poté ponoříme objektiv do imerzního oleje. Na konci pozorování je nutné očistit objektiv (buničinou navlhčenou benzinem).

Typy barvení:

- Barvení podle Grama
- Barvení na acidorezistenci podle Ziehl-Neelsena
- Barvení podle Giemsy
- Barvení metachromatických granulí podle Alberta
- Barvení podle Writze – Conklina
- Průkaz pouzder barvením podle Burriho

Barvení podle Grama

Barvení podle Grama rozděluje bakterie na **grampozitivní** a **gramnegativní**. Toto barvení je rychlé a jednoduché.

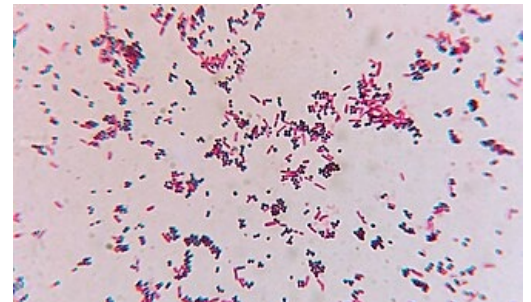
Principem je absorpce komplexu krystalové violeti s Lugolovým roztokem (roztok jodu v jodidu draselném) do bakteriálních buněk. Rozdělení bakterií do dvou skupin je založeno na rozdílném vymývání tohoto komplexu organickým rozpouštědlem (acetone) z bakteriální stěny. Správnější název by tedy bylo Gramovo odbarvování. K různému odbarvení dochází díky odlišné struktuře bakteriální stěny. Bakteriální stěna obsahuje peptidoglykan murein.

Stěna gramnegativních bakterií je tenká, obsahuje velké množství lipidů. Tenká stěna umožňuje lepší průnik organického rozpouštědla a snadné vymytí komplexu krystalové violeti z bakterií. Proto se musí stěna dobarvovat karbolfuchsinem na **růžovo**.

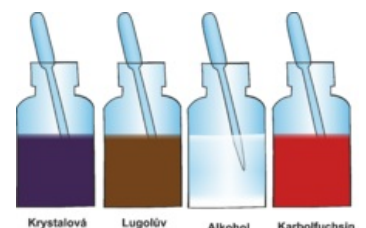
Stěna grampozitivní bakterií je silnější a vrstevnatá. Silná stěna v sobě zadrží krystalovou violet ve vazbě s jódem a nedochází k vymývání. Grampozitivní bakterie se díky krystalové violeti zbarví tmavě modře až **modrofialově**.

Postup barvení dle Grama:

1. Na připravený fixovaný preparát kápneme **krystalovou violet** a necháme ji působit.
2. Po 30 sekundách opláchneme vodou.
3. Pak přidáme **Lugolův roztok**, který obsahuje jód (jód tvoří komplex s krystalovou violetí).
4. Po 30 sekundách opláchneme vodou.
5. Poté aplikujeme **rozpuštědlo** (etanol nebo aceton).
6. Po 30 sekundách opláchneme vodou – grampozitivní bakterie díky silné stěně zůstanou obarveny, gramnegativní bakterie se odbarví.
7. Nakonec přidáme **karbolfuchsin** nebo safranin pro kontrast a dobarvení.
8. Po 30 sekundách opláchneme vodou – grampozitivní bakterie poté zůstávají stejně barevné, gramnegativní bakterie se barví do růžova.



Grampozitivní (tmavě modré) a gramnegativní (růžové) bakterie



Barvení dle Grama

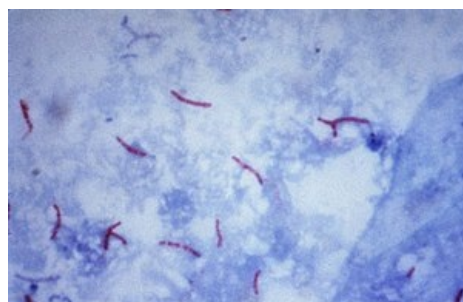
Barvení na acidorezistenci podle Ziehl-Neelsena

Barvení na acidorezistenci je určeno pro acidorezistentní bakterie rodu *Mycobacterium* a *Nocardia*. Tyto mikroorganismy se nebarví podle Grama kvůli buněčné stěně, která obsahuje lipidy s *mykolovými kyselinami*. Tyto lipidy špatně absorbují barviva a musejí se proto barvit za **horka**. Takto absorbovaná barviva se poté nedají vymýt ani odbarvením rozpouštědly s příměsí silných kyselin (acidorezistence) nebo zásad.

Acidorezistentní bakterie jsou karbolfuchsinem obarveny **růžově** až červeně. Kontrastní pozadí je **zelené** nebo modré.

Postup barvení dle Ziehl-Neelsena:

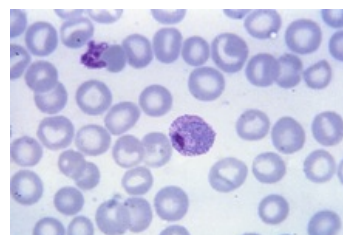
1. Na fixovaný preparát se nanese **karbolfuchsin** a při tom se zahřívá pomocí kahanu (barvení za horka).
2. Následně v šikmé poloze odbarvíme preparát pomocí **kyselého alkoholu**.
3. Preparát opláchneme v tekoucí vodě.
4. Poté dobarvujeme preparát pomocí **malachitové zeleně** (nebo metylénové modři) po dobu 30 sekund.
5. Poté preparát opět opláchneme tekoucí vodou.
6. Necháme usušit.



Mycobacterium tuberculosis podle Ziehl-Neelsena.

Barvení podle Giemsy

Giemsovo barvivo je roztok metylénové modři, azuru a eosinu v metanolu a glycerolu. Barvení je založeno na absorpci tohoto roztoku organickými strukturami. Používá se nejčastěji k obarvení krevního nátěru nebo fixovaného vaginálního stěru. Znázorňují se prvoci, chlamydie, bakterie, mykoplazmata, virové inkluze, orgány a buněčné struktury. Bakterie se barví modře, pouzdra světle modře, sliz růžově. Giemsov roztok se používá buď koncentrovaný, nebo ředěný destilovanou vodou.



Plasmodium vivax, obarveno podle Giemsy

Varianty

- Barvení dle Giemsy-Romanovského: znázornění chromozomů, diagnostika malárie;
- May-Grünwald-Giemsa: barvení leukocytů – diferenciální rozpočet.

Barvení podle Alberta

Barvení podle Alberta se využívá pro znázornění metachromatických granul. Fixovaný preparát se převrství Albertovým roztokem, pak se opláchne vodou a osuší. Následně se preparát přelije Lugolovým roztokem a znovu se opláchně a osuší. Bakterie jsou obarveny **zeleně**, metachromatická granula jsou **modrá**. Využívá se hlavně u *Corynebacterium spp.*

Barvení podle Writz - Conklina

Barvení podle Writz - Conklina slouží k znázornění bakteriálních spor, např. spory *Clostridium tetanii*. Fixovaný preparát se převrství roztokem malachitové zeleně a po opláchnutí se dobarvuje zředěným karbolfuchsinem. Bakteriální buňka je **růžová**, spory jsou **zelené**.

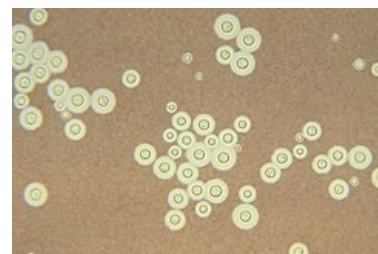
Barvení podle Burriho

Tato metoda umožňuje negativní znázornění bakteriálních **pouzder**.

Postup

1. Bakterie nanese na podložní sklíčko do kapky **tuši**;
2. pomocí druhého sklíčka kapku roztáhneme rovnoměrně po celé ploše, počkáme až uschne;
3. přebarvíme **krystalovou violetí**.

Bakterie se zobrazí fialově, pozadí černě a **slizové pouzdro se nebarví**.



Cryptococcus neoformans

Barvení mikromycet

Candida albicans a rod *Aspergillus* se barví podle Grama. Genciánová violet je specifické barvivo pro Zygomycety. *Cryptococcus* je kvasinka s polysacharidovým pouzdem, takže se barví tuší podle Burriho.

Barvení v parazitologii

Využívá se barvení podle Giemsy-Romanovského a barvení Gomoriho trichromem. Na parazity o velikosti desítek až stovek μm se používá suchý objektiv se 4x zvětšením. Barvení dle Ziehl-Neelsena se využívá na střešní kokcidie (*Toxoplasma gondii*).

Fluorescenční barvení

Nespecifická fluorescence se využívá v mykologii, kdy fluorescenční barvivo barví chitin v buněčné stěně hub. Fluorescenční barvení se také využívá v diagnostice tuberkulózy.

Odkazy

Související články

- barvení dle Grama
- bakteriální stěna

Použitá literatura

- HORÁČEK, Jiří. *Základy lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2000. sv. 1. ISBN 80-246-0006-4..
- GOERING, Richard V a Hazel M DOCKRELL. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha : Triton, 2016. 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.