

Protokol č.5 Acidorezistentní barvení

Acidorezistentní bakterie špatně přijímají barvivo. Barvení se proto provádí za horka koncentrovanými barvivou. Již jednou obarvené buněčné stěny si barvivo podržují i po odbarvování kyselinami a alkoholem.

Acidorezistenci vykazují zástupci rodů *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, v menší míře *Corynebacterium*. Jejich buněčná stěna obsahuje lipidické látky, především mykolové kyseliny. Ty brání průniku barviv a tak se velmi špatně barví Gramovým barvením.

Buněčné stěny acidorezistentních bakterií se **neodbarvují** kyselým alkoholem (1.stupeň acidorezistence) a 1% HCl (2.stupeň acidorezistence) po obarvení Ziehl-Neelsenovým karbolfuchsinem.

Význam: používá se hlavně na identifikaci mykobakterií, zejména k průkazu *Mycobacterium tuberculosis*. Kromě toho je acidorezistence vlastností některých aktinomycet, bakteriálních spor a některých kvasinek (askospory).

Buněčná stěna acidorezistentních bakterií

- obsahuje lipidické látky, především mykolové kyseliny (3-hydroxy mastné kys. s dlouhým C řetězcem na pozici 2)
- mykobakteria, nokardioformní aktinomycety, korynebakteria
- mykoly-l-arabinogalaktan tvoří lipidickou bariéru – brání penetraci kyseliny
- odbarvování 1. kyselým alkoholem, 2. slabou kyselinou

Odlišnosti ve složení peptidoglykanu

- přítomnost amidických skupin na glutamátu i na meso-DAP v peptidech opakující se peptidické podjednotky
- přítomnost 2 typů mezipeptidového spojení – D-ala-meso-DAP a meso DAP-DAP, 70% meso DAP-DAP – pouze u mykobakterií
- N-glykolylmuramová kyselina místo
N-acetylmuramové

Mikroorganismy:

Mycobacterium phlei CCM 5639 – 1. stupeň

- rychle rostoucí mykobakteria. Tráva (*Phleum*), seno. medium č.24
- 22-52°C
- krátké tyčky, 1-2 um, acidorezistence 2 stupně u mladých kultur (3-4denní), více než 5ti denní acidorezistentní v rozmezí 5 – 100%.
- drsné kolonie s intenzivním žlutým až oranžovým pigmentem po 2-5ti dnech
- mladé kultury acidorezistentní, po 5 – 7 dnech kultivace může být barvitelnost nestabilní

2. stupeň acidorezistence:

Nocardia carnea CCM 2756

Rhodococcus erythropolis CCM 277

Corynebacterium glutamicum CCM 2428

| <i>Mycobacterium</i> | <i>Nocardia</i> | <i>Rhodococcus</i> | <i>Corynebacterium</i> |
|--|--|---|---|
| Rovné nebo mírně zakřivené tyčky, 0,2-0,6 x 1-10 µm zřídka větvená vlákna, netvoří vzdušné mycelium | Mycelium Starší kultury: fragmentace Vláken v tyčinky a koky Obvykle tvoří vzdušné mycelium | Slabé mycelium, Fragmentují v nepravidelné tyčky a koky Netvoří vzdušné mycelium | Nepravidelné tyčinky Často svírají úhel Nebo tvoří palisády |
| Rychlost růstu: 2-40 dní | 1-5 dní | 1-3 dny | 1-2 dny |
| Acidorezistence 1. stupně Nemusí být 2. stupeň | Acidorezistence 2. stupně | Acidorezistence 2. stupně | Acidorezistence 2. stupně |
| Špatně barvitelné Gramovým barvením, Pokud ano, tak G+ | Barvitelné Gramem | Barvitelné Gramem | Barvitelné Gramem |
| Penicilin rezistentní (některé druhy mohou být seznávané, Příklad: <i>M. avium</i>) | Penicilin rezistentní | Penicilin seznávané | Penicilin seznávané |

Pomůcky: Ziehl-Neelsenův karbolfuchsin, kyselý alkohol (96% alkoholu se 3% HCl), Löfflerův roztok methylenové modři (před použitím zředěný 1:10), 1% HCl – pro důkaz druhého stupně acidorezistence

Postup Ziehl-Neelsenova barvení:

- 1) Příprava plamenem fixovaného preparátu
- 2) Převrstvit koncentrovaným karbolfuchsinem
- 3) Zahřát do výstupu par, pak 3 – 5 minut – nesmí vařit
- 4) Oplach kyselým alkoholem (dvakrát max. 15s)
- 5) Dobarvit Löfflerovou methylenovou modří – 30s
- 6) Oplach vodou

Jiný postup:

Postup: na čistém podložním sklíčku provedeme nátěr a fixujeme plamenem. Přelijeme ho karbolfuchsinem ve vysoké vrstvě a zahříváme až do výstupu par. Po zchlazení znovu zahříváme, což opakujeme celkem 3x. Po posledním zahřátí necháme barvivo působit 3-5 minut. Barvivo nesmí na sklíčku zaschnout, ani se vařit – proto je během barvení podle potřeby doléváme. Po uvedené době barvivo slijeme a preparát odbarvujeme v šikmé poloze kyselým alkoholem tak dlouho, dokud se z nátěru smývá červený fuchsin. Preparát opláchneme vodou (má být lehce narůžovělý) a nátěr dobarvíme roztokem malachitové zeleně (1 minutu). Znovu opláchneme vodou a v šikmé poloze necháme oschnout. Prohlížíme imerzním objektivem meandrovitým způsobem (asi 50 zorných polí).

Postup Kenyounovo barvení – modifikace acidorezistentního barvení:

Jedná se o modifikaci acidorezistentního barvení a používá se u částečně až slabě acidorezistentních bakterií. Ty jsou alkoholem odbarvovány, nikoliv však slabými kyselinami. Kyselý alkohol je zde nahrazen 1% kyselinou chlorovodíkovou.

❖ Pro informaci:

Fluorescenční barvení - detekce a diagnostika mykobakterií

Princip: některé látky pod vlivem ultrafialového nebo modrého záření emitují část absorbované energie ve formě viditelného světla. Tento jev se označujeme jako fluorescence a vzniká v důsledku intramolekulární přeměny energie. Jsou-li zmíněné látky přítomny v buňce (např. riboflavin, chlorofyl), mluvíme o **primární fluorescenci** (přirozené). **Sekundární fluorescence** je vyvolána zabarvením sledovaných částí fluoreskujícími barvivy tzv. fluorochromy. Nejčastěji se používá akridinová oranž, primulin apod. Sekundární fluorescenci lze využít pro detekci mikroorganismů, v diagnostice mykobakterií, při studiu povrchových struktur buněčných stěn hub apod.

Odborná literatura:

1. ŠILHÁNKOVÁ L., DEMNEROVÁ K. *Návody pro laboratoře z mikrobiologie. SNTL Praha, 1985.*
2. VYTRÁSOVÁ J., BÍLKOVÁ Z.: *Návody pro laboratoře z mikrobiologie. Univerzita Pardubice, 1998.*

http://webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Obecna_klinicka_mikrobiologie/Laboratorni_cviceni/Navody/Mikroskopicke_preparaty.pdf

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/cytologie>

Mycobacterium

Rovné nebo mírně zakřivené tyčky, zřídka větvená vlákna, 0,2-0,6 x 1-10 μm

Netvoří vzdušné mycelium

Nepohyblivé. Aerobní, ačkoliv

Obligátní paraziti a saprofyti, optimum růstu je 30 – 45°C.

Vysoký obsah buněčných a cytoplazmatických lipidů, s vosky obsahujícími v chloroformu rozpustné mykolové kyseliny s dlouhým větveným řetězcem (60-90C): rezistence vůči barvivům, vysychání, antibiotikům, fagocytóze

Buněčná stěna – peptidoglykolipid (obsah meso-DAP, Ala, Glu, glukózamin, kyselinu muramová, arabinóza, galaktóza

Kolonie s oranžovým či žlutým pigmentem, zřídka růžovým (karotenoidy).

Kolonie drsné, květákovité. Löwestein-Jenssenova půda. Někdy hladké – z klinického materiálu.

G+C = 62-70 mol%.

- mykologické kyseliny s 60 – 90 C
- ◆způsobují rezistenci vůči pronikání barviv, antibiotik, vůči vysychání a fagocytóze
- silně acidorezistentní
- pokud jsou jednou obarveny bazickým barvivem (fuchsin) neobarvují se kyselinami ani kyselými organickými rozpouštědly (alkoholem)
- barvení za horka (lipidy nepropouští barvivo) a nepravidelné (buňka není rovnoměrně obarvena), vůbec nebo špatně se barví Gramovým barvením



cord-faktor – glykolipid trehalóza 6,6 – dimykolát ve stěně mykobakterií, významný patogenní faktor, inhibice polymorfonukleárů, funkční poškození oxidativní fosforylace

Hydrofobní buněčná stěna

- problém s transportem Fe
- siderofory – Fe chelatizující látky
- ◆exocheliny – extracelulární
- ◆mykobaktiny – uvnitř buněčného obalu

Pomalý růst

- zpomalení transportu přes hydrofobní povrch
- RNA polymeráza – nižší reakční rychlost, pomalejší syntéza rRNA
- nízký poměr RNA/ DNA – pomalejší syntéza proteinů

Metabolismus

- využívání různých typů uhlovodíků (halogenované ...)
- autotrofní růst na CO₂ a H₂O

Produkce karotenoidních pigmentů

- bez pigmentace – *M. tuberculosis*
- fotochromogenní – *M. kansasii*
- skotochromogenní – *M. goodii*

Nápadný je velmi pomalý růst s dlouhou generační dobou u většiny z nich. Rod mykobakterií obsahuje **několik desítek druhů**, z nichž některé jsou významnými patogeny v lidské medicíně. Nepatogenní, popř. podmíněně patogenní druhy se vyskytují ve vodě, v půdě, některá u zvířat. Mykobakterie jsou intracelulárními parazity vyvolávajícími chronickou infekci s tvorbou granulomů. V obraně má význam její buněčná imunita. K diagnostice se používá přímý mikroskopický průkaz (Ziehl-Neelsenovo barvení, fluorescenční mikroskopie), kultivace na spec. půdách, pokus na zvířeti (morčeti), metody molekulární biologie (PCR)

Etiologie tuberkulózy

- v roce 1882 Robert Koch objevil tuberkulózní bacil (Kochův bacil), dnes označovaný jako ***Mycobacterium tuberculosis***
- patří do rodu ***Mycobacterium***, čeledi ***Mycobacteriaceae*** a řádu ***Aktinomycetales***
- v klasifikaci mikroorganismů jsou mykobakteria řazena na rozhraní mezi vyššími organismy, houbami a plísněmi a pravými bakteriemi (název je odvozen od řeckých slov mykes – plísně a bacterion – tyčka)

Rozeznáváme **mykobakteria klasická**, vyvolávající tuberkulózní onemocnění, a **netuberkulózní mykobakteria**, vyvolávající mykobakteriíózy (*M. kansasii*, *M. avium*). Ke klasickým mykobakteriím řadíme:

- **Mycobacterium tuberculosis** – patogenní pro člověka,
- **Mycobacterium africanum** – vyskytuje se převážně v tropické Africe, v Evropě zcela výjimečně, patogenní pro člověka,
- **Mycobacterium bovis** – patogenní pro skot i pro člověka

- základní vlastností mykobakterií je **acidorezistence** a **alkoholrezistence** – příčinou je vysoký obsah tukových látek v těle mykobakterií

- tvarově jsou rovné nebo lehce zahnuté, granulované tyčinky, s oblými konci o délce 1 – 4 μm . Mohou být izolovaná nebo podélně uspořádaná ve shlucích.

- kritická teplota, při které dochází k denaturaci mykobakteriálních proteinů a mykobakteria hynou, je **60°C**

- chlad, a to i teploty blízké se absolutní nule, bakterie nepoškozují, ve zmrzlém stavu vydrží i léta