

## Všeobecná mikrobiológia praktické cvičenie 11. týždeň

### Biochemické vlastnosti mikroorganizmov 2. časť

#### – produkcia enzýmov a toxínov

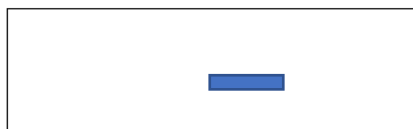
#### Téma : Bakteriálne enzýmy a toxíny.

1. Katalázová a oxidázová aktivita baktérií :

a/ Katalázová aktivita:



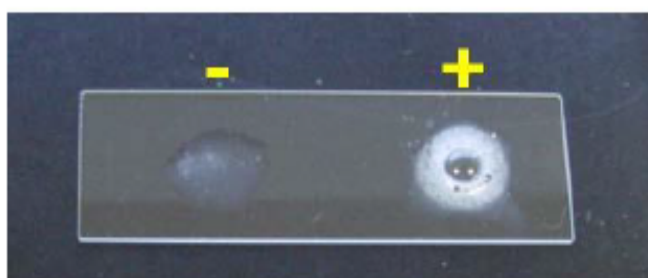
*Staphylococcus aureus*



*Streptococcus pyogenes*

#### B. Dôkaz produkcie katalázy

Kataláza je enzým, ktorý konvertuje peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ), pričom vzniká kyslík a voda. Na testované kolónie kvapneme peroxid vodíka. Ak testované bakteriálne bunky produkujú katalázu, pozitívna reakcia sa prejaví vznikom bublinek kyslíka. Test je možné urobiť aj na podložnom sklíčku, kedy do kvapky peroxidu vodíka na podložnom sklíčku pridáme sterilnou bakteriologickou kľučkou kolóniu testovaných baktérii. Pozitívny výsledok sa opäť prejaví vznikom bublinek kyslíka. Enzým kataláza je produkovaný väčšinou aeróbnymi a fakultatívne anaeróbnymi baktériami, hlavnou výnimkou sú streptokoky, ktoré sú kataláza-negatívne. Dôkaz produkcie katalázy patrí medzi základné testy, používané na odlišenie stafylokokov (kataláza-pozitívne) od streptokokov (kataláza-negatívne).



Obr.4. Katalázový test - pozitívny výsledok vpravo (viditeľné bublinky kyslíka).

<http://www.fidanoski.ca/medicine/staphylococcus-streptococcus.htm>

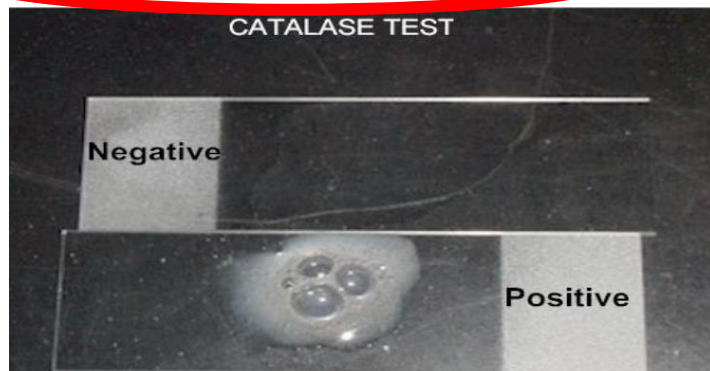
## Detekcia katalázy

Kataláza: - enzym, hydrolyzujúci  $H_2O_2$ , ktorý je toxický pre bunku pričom vzniká kyslík (prejaví sa ako bublinky)..

Pozitívny u Stafylokokov, negatívny u streptokokov

### Dôkaz produkcie katalázy

- Do skúmavky (alebo na podložné sklíčko) s 3% peroxidom vodíka penesieme bakteriologickou kľučkou vyšetrovanú kolóniu
- Pozitívny výsledok = bublinky kyslíka



b/ Oxidázová aktivita :

<i>Moraxella catarrhalis</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+

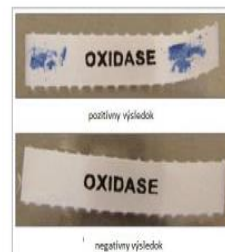
### C. Cytochromoxidázový test (oxidázový test)

Cytochrómoxidázový test sa používa na detekciu produkcie cytochrómoxidázy. **Pozitívny výsledok:** Kovacsovo činidlo (tetrametyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid) po pridaní ku baktériám, ktoré obsahujú cytochróm c ako časť respiračného reťazca, zmení farbu (sčernie). Neissérie majú oxidázovú reakciu pozitívnu. Prejaví sa po 10 sekundách sčernením kolónií po pridaní činidla priamo do petriho misky, alebo ak sa baktérie nanesú na prúžok filtračného papiera napusteného činidlom, v mieste nánosu sa objaví tmavofialová farba.

**Negatívny výsledok:** nedôjde k sčerneniu kolónií v petriho miske alebo sa neobjaví fialová farba na prúžku filtračného papiera.



Obr. 33. Oxidázová reakcia – sčernenie kolónií *N. meningitidis* po pridaní činidla.  
[http://bluegrass.kctcs.edu/en/Natural\\_Sciences/Biology/Virtual\\_Labs/Virtual\\_Lab\\_4.aspx](http://bluegrass.kctcs.edu/en/Natural_Sciences/Biology/Virtual_Labs/Virtual_Lab_4.aspx)



Obr. 34. Oxidázová reakcia – pozitívny a negatívny výsledok. Pozitívny výsledok sa prejaví vznikom fialovej farby po nanesení vyšetrovaných baktérií.  
<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chp07-is-characterization-mm.html>

## 2. Koagulázový test :

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	Prevedenie testu
viazaná koaguláza	—	+	
voľná koaguláza	—	+	

### E. Dôkaz produkcie plazmakoagulázy

#### Odlíšenie *S. aureus* a *S. epidermidis* - podľa produkcie voľnej a viazanej plazmakoagulázy

Kmene *S. aureus* produkujú dve formy plazmakoagulázy, voľnú a viazanú. Viazaná plazmakoaguláza (viazaná na bunkovú stenu stafylokokov, angl. clumping factor) priamo konvertuje fibrinogén na nerozpustný fibrín. Voľná plazmakoaguláza reaguje s globulínovým plazma faktorom (coagulase-reacting factor) a formuje stafylofibrín, ktorý katalyzuje premenu fibrinogénu na nerozpustný fibrín. Úloha plazmakoagulázy v patogenéze ochorení zatiaľ nie je jasná, ale predpokladá sa, že môže vytvárať fibrínový obal okolo stafylokokových abscesov, lokalizovať tak infekciu a chrániť stafylokoky pred fagocytózou.

#### DÔKAZ PRODUKCIE VIAZANEJ PLAZMAKOAGULÁZY:

##### Skličková metóda

- V 2 kvapkách sterilnej vody alebo fyziologického roztoku vytvorte suspenziu testovaného kmeňa
- pridajte kvapku králičej plazmy, výsledok odčítajte o 10-15 sekúnd.
- **Pozitívny výsledok – vytvorenie bielych zhlukov (vláken) fibrínu**
- Negatívny výsledok musí byť potvrdený skúmavkovou metódou



**Obr. 7. Dôkaz viazanej plazmakoagulázy.**

<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

## DÔKAZ PRODUKCIE VOĽNEJ PLAZMAKOAGULÁZY:

### Skúmavková metóda

- kolónia testovaného kmeňa sa rozmieša v 0,5 ml králičej plazmy. Inkubuje sa 6 hodín pri 37°C, potom pri izbovej teplote 24 hodín
- Odčítava sa za 1 hodinu, 2 hodiny a za 24 hodín
- **Pozitívny výsledok** – vytvorenie koagula v skúmavke
- Kvôli nožnej prítomnosti fibrinolýzínu v plazme môže byť koagulum počas inkubácie rozpustené, preto je výsledok testu potrebné odčítavať po 1hodine, 2 hodinách a po 24 hodinách



Obr. 8. Dôkaz voľnej plazmakoagulázy.

### 3. Proteolytické vlastnosti:

- Niektoré kmene určitých baktérií produkujú proteolytické enzýmy schopné rozkladať bielkovinové súčasti tkanív. Takéto kmene sú patogénnejšie
- V podmienkach in vitro dokazujeme proteolytickú aktivitu dôkazom rozpustnosti želatíny
- Demonštrujeme kmeň *E. coli* – negat., *Ps.aeruginosa* – pozit., *Proteus mirabilis* – pozit. metódou želatínových diskov, platňovou metódou a na obrázkoch
- Skúmavková metóda – agarová pôda naliata v skúmavke sa naočkuje testovaným kmeňom vpichom a inkubuje pri 37°C.
- hodinu pred odčítavaním sa skúmavka uloží do chladničky.
- Kmeň s proteolyticou aktivitou rozpustí želatínu, ktorá späť nestuhne ani v chlade.
- Platňová metóda (Clark) – agarová pôda s obsahom želatíny sa naočkuje čiarou testovaného kmeňa – preleje sa diagnostickým roztokom a odčítava sa prejasnenie okolo pôdy (obr.a demonštrácia )
- Metóda želatínových diskov ( Kohn) –
- do tekutej pôdy sa naočkuje testovaný kmeň a vhodí sa želatínový uhlíkový disk.
- V skúmavke s kmeňom s proteolytickými vlastnosťami dôjde k rozpusteniu disku a sfarbeniu tekutiny uhlíkom.(demonštrácia)



#### 4. Dôkaz toxigenicity u *Corynebacterium diphtheriae* :

##### a/ in vitro ( Elekova metóda )

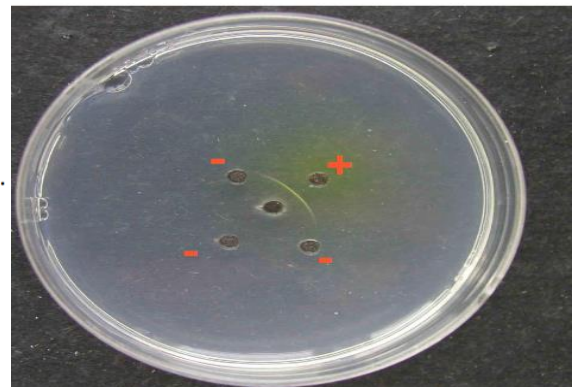
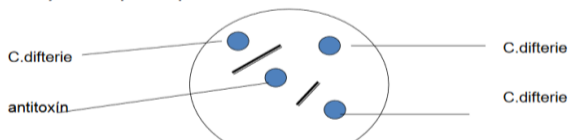
Toxigénne kmene *C. diphtheriae* vyvolávajú záškrt. Lokalizovaná diftéria, diftéria postihujúca tonzily, diftéria postihujúca hltan sa prejaví náhlou nevoľnosťou, bolesťami hrdla a bolesťami pri prehltaní, zriedkavo sa môže objaviť vracanie. Diftéria postihujúca nos sa vyskytuje prevažne u dojčiat a malých detí. V dýchacích cestách sa vytvárajú pevne adherujúce membrány, ktoré môžu uzavrieť dýchacie cesty.

Difterický toxín je AB toxín - obsahuje jediné disulfidické väzby. Jej natrávením trypsinom vzniknú 2 fragmenty A a B. B je väzbový, ktorý sa naviaže na povrch bunky, vtedy sa pomocou proteáz uvoľní A fragment, ktorý vstúpi do bunky. Jeho účinok je ADP ribosyltransferázový – inaktivuje translačný elongačný faktor EF2, zodpovedný za predlžovanie proteínového reťazca pri proteosyntéze. Exotoxín je imunogénny a protilátky proti nemu sú protetické.

### Elekova metóda

#### Elekova metóda na dôkaz toxínu *C. diphtheriae*

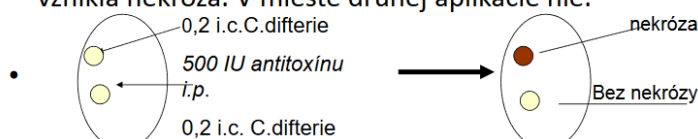
- Imunodifúzia v geli – do gelu sa urobia jamky do ktorých sa kvapne suspenzia testovaného kmeňa a do stredu antitoxín. Dôjde k difúzii tekutiny do gelu. V mieste stretnutia sa toxínu s antitoxínom sa vytvorí precipitačná línia.



##### b/ in vivo

#### Uloha 3: Dôkaz toxínu *Corynebacterium diphtheriae*

- In vivo** – dôkaz toxínu pokusom na zvierati (teoreticky) – Z kolónie *C. diphtheriae* z Loefflerovho sérového média sa urobí suspenzia v BHI - brain heart infusion a inkubuje sa pri 35°C 48 hod. Škrečok, morské prasiatko – sa vyholí a i.c. sa aplikuje 0,2 ml roztoku. Po 5 hodinách sa intraperitoneálne aplikuje 500 IU difterického antitoxínu a o 30 minút sa opäť i.c. aplikuje 0,2 ml roztoku so skúmaným kmeňom v blízkosti prvej aplikácie. Odčítavame za 24-48 hodín. V mieste prvej aplikácie vznikla nekróza. V mieste druhej aplikácie nie.

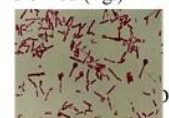


## 5. Dôkaz tetanickeho toxínu ( tetanospasmínu) pokusom na zvierati – teoreticky.

### *Clostridium tetani* toxin



- Cultivation in anaerobic conditions
- Microscopy: G positive rods with spores located at the end of rod (fig.)



#### Úloha 4: Dôkaz toxínu *Clostridium tetani*

- Kultiváciou v anaeróbných podmienkach
- Mikroskopický obraz so spórmi umiestnenými na konci G+paličky (paličky na bubon)(obr.)
- Pokus na zvierati (obr.)  
(prípadne ako neutralizačný test)
  - celkový účinok tetanu – opisthotonus myši- esovito prehnutý chvostík
  - lokálny tetanus – vztýčený chvost

- Animal trial (fig..) thest for neutralisation)
  - generalised tetanus : tetanus in a mouse showing body curvature (opisthotonos)



Local tetanus – erected tail



*Clostridium tetani* je neinvazívny mikroorganizmus, produkuje dva toxíny: **tetanolyzín** – oxygénlabilný hemolyzín a **tetanospazmín** – plazmidom kódovaný termolabilný neurotoxín (exotoxín jediného antigénneho typu). Plazmid nesúci gén pre tetanospazmín je nekonjugatívny (netoxické *C. tetani* nemôže byť konvertované na toxické). Tetanospazmín je A-B toxín. Inaktivuje proteíny regulujúce uvoľňovanie inhibičných neurotransmiterov, čo vedie k neregulovanej excitačnej synaptickej aktivite na motorických neurónoch. Väzba toxínu na cieľové štruktúry je ireverzibilná, výsledkom jeho pôsobenia je **spastická paralýza**.

#### Zdroje:

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrobiológia nielen pre medikov - 2. upravené a doplnené vydanie. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 27. 04. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.ifmed.uniba.sk//clanky.php?aid=398>. ISSN 1337-7396.

[https://uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/Slov\\_Praktika\\_LS/Mikrobiologia\\_1/prakt\\_cv\\_10\\_-\\_11\\_enzymy\\_toxiny.pdf](https://uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/Slov_Praktika_LS/Mikrobiologia_1/prakt_cv_10_-_11_enzymy_toxiny.pdf)