

Praktické cvičenie č. 10-11
Biochemické vlastnosti
mikroorganizmov II.

Produkcia enzýmov a toxínov

Enzýmy

- **Koaguláza** -viazaná (fibrinogén - fibrín) a voľná (cez medziprodukty), tvorba fibrínovej vrstvy a abscesu - ochrana pred fagocytózou
- **Kataláza** - premena toxického H_2O_2 -- $H_2O + O_2$
- **Fibrinolýzín**- stafylokináza - rozpúšťa fibrínový trombus
- **Lipáza** - rôzne typy, prežívanie St.v seboroických oblastiach - prenikanie do kože a podkožia, tvorba povrchových kožných inf.
- **Hyaluronidáza** - rozrušuje mukopolysacharidy v spojivovom tkanive, šírenie
- **Nukleáza** - termostabilný E
- **Penicilináza** - beta laktamáza, enzým rozrušujúci betalaktámový kruh PNC antibiotík

Toxíny

- Bakteriálne toxíny sa delia na exotoxíny a endotoxíny

Bakteriálne exotoxíny sú toxické vysokomolekulárne termolabilné proteíny s imunogénnymi vlastnosťami.

- Sú imunogénne - v organizme vyvolávajú tvorbu špecifických protilátok - antitoxínov, ktoré majú protektívny (ochranný) účinok.
- Detoxikáciou (napr. formaldehydom) strácajú biologický účinok, ale zachovávajú si antigenicitu a menia sa na toxoidy (anatoxíny), ktoré sa využívajú k aktívnej imunizácii.
- Imunizáciou zvierat aktívnymi alebo detoxikovanými toxínmi sa získavajú antitoxické séra (napr. antidifterické, antibotulinické, antitetanové a pod.), ktoré sa používajú u ľudí na pasívnu imunizáciu pre profylaktické a terapeutické účely.

Toxíny

- Bakteriálne endotoxíny sú (na rozdiel od exotoxínov produkovaných do prostredia pri rozmnožovaní baktérií) pevne viazané na bunkovú stenu a tvoria súčasť jej štruktúry.
- Z bunky sa uvoľňujú až po jej rozpadnutí.
- Patrí sem lipopolysacharid G- baktérií (LPS)
- teichoová kyselina spolu s fragmentmi peptidoklykanu G+ baktérií.

Toxíny

- endotoxín = lipopolysacharidový komplex z b. steny G-baktérií (nejde o toxín pochádzajúci zvnútra baktérie, ale o látku, ktorá sa nachádza v ich povrchovej vrstve)
- -endotoxíny – najrozšírenejšie bakteriálne Ag, s ktorými sa organizmus teplokrvných živočíchov dostáva do styku už ihneď po narodení (kolonizácia črevného traktu baktériami). Podmienkou prežitia je vytvorenie účinných Ab.
- -endotoxínový komplex sa uvoľňuje do okolitého prostredia vtedy, keď sa baktérie roypadnú. Endotoxín spúšťa veľkú množstvo biologických reakcií:
- -menšie dávky spôsobujú zvýšenie telesnej T, zmeny v množstve cirkulujúcich Leu, zvýšenie glukózy v krvi a iné
- -ovplyvňuje cievny systém, uvoľnenie katecholamínov a glukokortikoidov, metabolizmus bb. a tkanív
- -menia FA a znižujú prirodzenú rezistenciu proti infekcii
- -väčšia dávka endotoxínov → smrteľný šok

Toxíny

Podľa cieľových orgánov, na ktoré toxíny pôsobia sa delia na:

1)neurotoxíny (napr. botulotoxíny, tetanospazmín)

2)enterotoxíny (cholérágén, termolabilný a termostabilný enterotoxín *E. coli*, stafylokokové enterotoxíny)

3)dermonekrotoxíny (difterický, stafylokokový a-toxín - hemolyzín, toxíny *Arcanobacterium haemolyticum*)

4)kardiotoxíny (difterický toxín, oxygénlabilný streptolyzín)

5)kapilarotoxíny (toxín *B. anthracis*)

6)hemolyzíny (klostrídiové, stafylokokové, streptokokové, tetanolyzín, listeriolyzín, pneumolyzín)

7)toxíny s vlastnosťami superantigénov (stafylokokový TSST-1, streptokokové pyrogénne toxíny a ďalšie).

Toxíny

- **Exotoxíny** - erytrogénny toxín - termolabilné A,B,C - hypersenzitivita, endotoxínová, cytotoxická, nešpecificky mitogénna T a imunosupresívna B lymfocytová aktivita, raš při šarlachu
- Dickov test, Schultzov test
- **Streptolyzín S** - oxgén stabilný, lýza ery, uvoľňovanie lyzozýmu, neimunogénny
- **Streptolyzín O** - reverzibilne inaktivovaný kyslíkom, imunogénny, protilátky proti streptolyzínu O - ASLO, usmrcovanie leukocytov
- **Streptokináza** - lýza krvných trombusov, rozšírenie streptokokov
- **DN-áza** - necytolytický, depolymerizáci voľnej DNA - v hnise, znižovanie viskozity hnisu a šíreni

Toxíny

- **Streptokoky A vylučujú exotoxín streptolyzín O.**
- **Protilátky proti streptolyzínu O sa volajú antistreptolyzín O (ASLO).**
- **Vysoký titer týchto protilátok (vysoké ASLO) svedčí o čerstvej streptokokovej infekcii.**
- **Najimunogénnejšia časť streptokokov A je ich povrchová zložka M-proteín.**

Dôkaz produkcie katalázy

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

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

CATALASE TEST

Negative

Positive



Catalase +



Catalase -



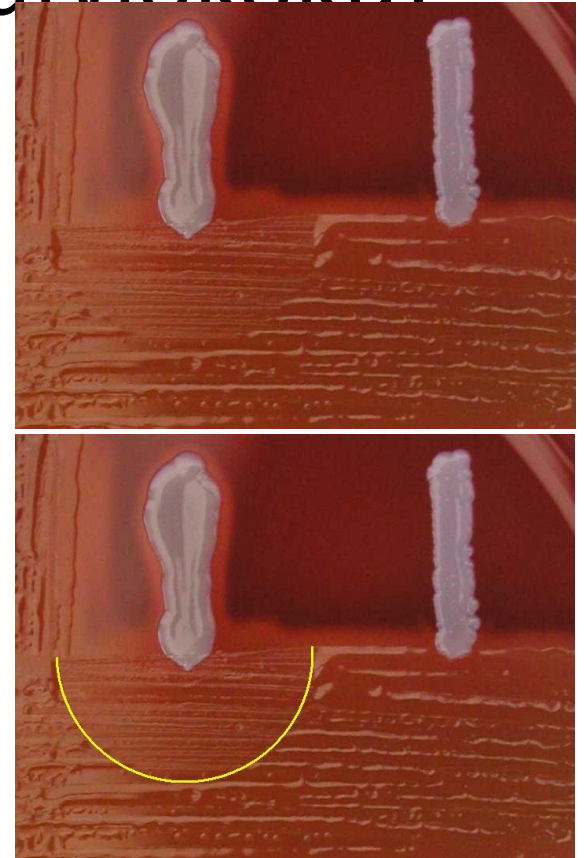
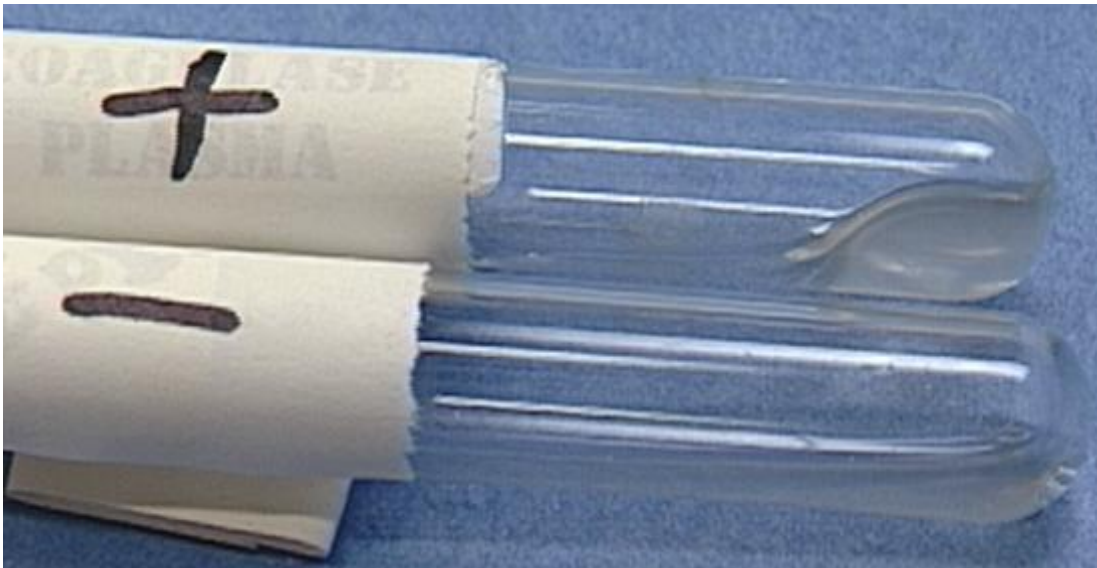
Úloha 1 : Dôkaz koagulázy (PK)

- Koaguláza – protein neznámej chemickej štruktúry s protrombínu podobnou aktivitou. Konvertuje fibrinogén na fibrín a tvorí viditeľné koagulum. In vivo sa prejaví fibrínovou bariérou – absces – Staphylococcus aureus. In vitro – sa používa na dif.dg- Staphylococcus aureus: PK+ a ostatné stafylokoky: PK –
- Existuje:
 - voľná – nachádzajúca sa vo filtráte bakteriálnej kultúry, dôkaz skúmavkovou metódou
 - viazaná – na bakteriálnu stenu, clumping factor, sklíčková metóda

Úloha 1: Dôkaz koagulázy - voľnej

- Skúmavková metóda – kolónia testovaného kmeňa sa emulguje v 0,5 ml plazmy. Inkubuje sa 6 hodín pri 37°C a potom pri izbovej teplote.
- Odčítavanie po 1 hodine, 2 hodinách a po 24 hodinách.
- Spôsob – naklonenie skúmavky – sledovanie koagula. Vytvorenie koagula = pozit.,
- Vzhľadom na možnú prítomnosť fibrinogénu v plazme. Môže táto koagulum rozpustiť, preto sa odčítava po 1 aj 2 hodinách, nielen po 24 hodinách. obr.,

Plasmakoaguláza a hyaluronidáza (oba testy se užívají u stafylokoků)



Dôkaz koagulázy viazanej

- Sklíčková metóda
- V 2 kvapkách sterilnej vody alebo fyziologického roztoku sa urobí suspenzia testovanej kolónie a pridá sa roztok koagulázy. Kývavým pohybom sa zmiešajú obidve tekutiny. Odčítava sa o 10-15 sekúnd.
- Hodnotenie – vytvorenie bieleho precipitátu, aglutinácia = pozit.
- Negatívny výsledok treba potvrdiť skúmavkovým testom obr.

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 želatinových diskov, platňovou metódou a na obrázkoch

Dôkaz proteolytickej aktivity

- 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.

Dôkaz proteolytickej aktivity

- Platňová metóda (Clark) – agarová pôda s obsahom želatiny sa naočkuje čiarou testovaného kmeňa – preleje sa diagnostickým roztokom a odčítava sa prejasnenie okolo pôdy (obr.a demonštrácia)

Dôkaz proteolytickej aktivity

- 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)

Úloha 3 : proteolytické vlastnosti *Pseudomonas aeruginosa*

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Proteus vulgaris*
- *Escherichia coli*

Dôkaz oxidázy

- Filtračný papier napustený parafenylendiamínom a alfa-naftolom priložíme (alebo priamo na papier nanesieme) na vyšetrovanú kolóniu
- **Pozitívny výsledok = zmodranie papierika**

Oxidase
neg.



Oxidase
pos.

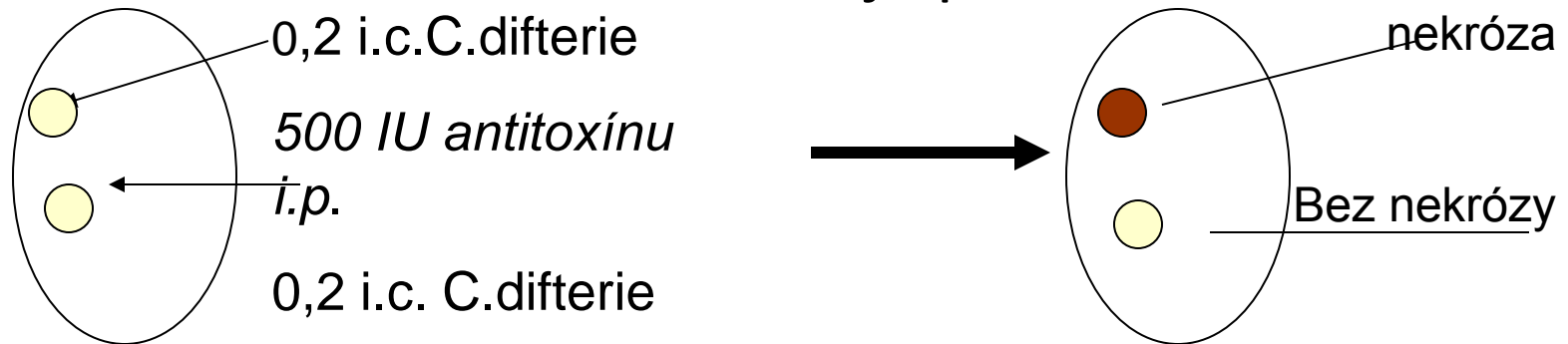


Dôkaz toxínov

- Niektoré sú schopné produkovať exotoxíny. Ich dôkaz má význam diagnostický, pretože kmeň bez toxickej aktivity nemusí byť patogénny – *Corynebacterium diphtheriae* – fágový prenos.
- U *Clostridium tetani* sa testy in vitro používajú skôr na dôkaz účinnosti toxínu stanovovaním LD – letálnej dávky, prípadne na overenie toxicity kmeňa.
- Nepoužíva sa na diagnostické účely v medicíne

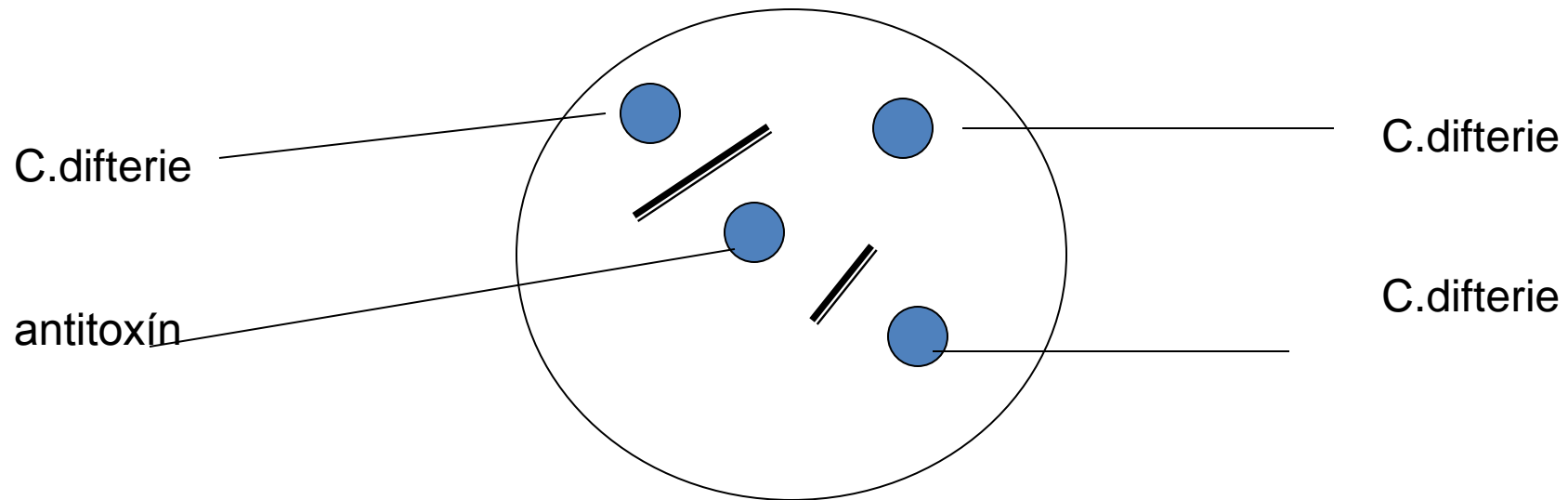
Úloha 3: Dôkaz toxínu *Corynebacterium diphtheriae*

- **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 intrapertoneálne 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.

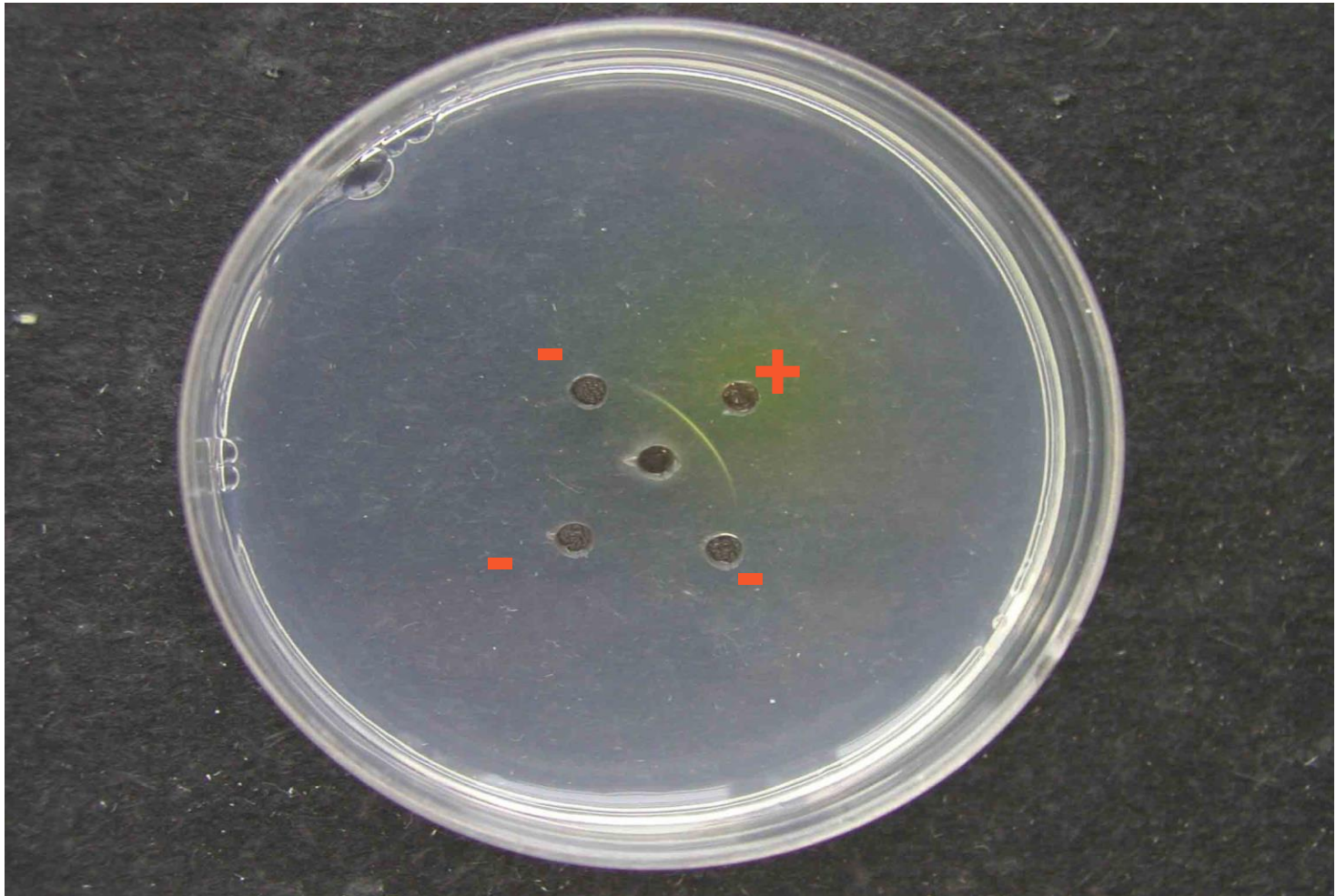


Elekova metóda na dôkaz toxínu *C. diphtheriae*

- 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.



Elekova metoda



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 – opistotonus myši- esovito prehnutý chvostík
 - lokálny tetanus – vztýčený chvost

