

Bakteriológia



Identikačné metódy v bakteriológii

Ing. Lukáš Hleba, PhD.

Izolačné a kultivačné techniky

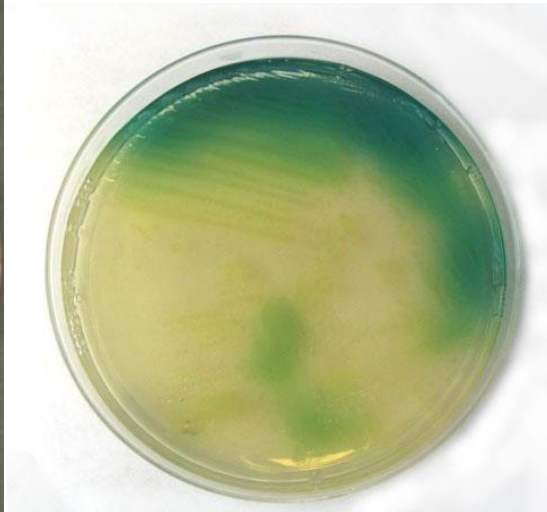
- prvotné ciele, vlastnosti MO, informácie
- Izolácia – z prirodzeného prostredia (habitatu)
- Napodobnenie podmienok prostredia
- Všeobecné živné pôdy – chemicky nedefinované
- Selektívne živné pôdy – chemicky definované
- Kultivačné podmienky – teplota, čas, pH, živiny, prítomnosť kyslíka, esenciálne zložky, inhibičné zložky pôd,

Základná identifikácia

- Kultiváciou na selektívnych živných pôdach (napr. *E. coli* na Endovom agare – tvorí kolónie s kovovým leskom, *Lactobacillus* sp. na MRS agare, *Enterococcus* sp. na SB agare a pod.)
- Mikroskopia – tvary baktérií, usporiadanie, gramovo farbenie, tvorba endospór, pohyb,
- Makroskopia - rast, vôňa, teplota kultivácie, dĺžka kultivácie...

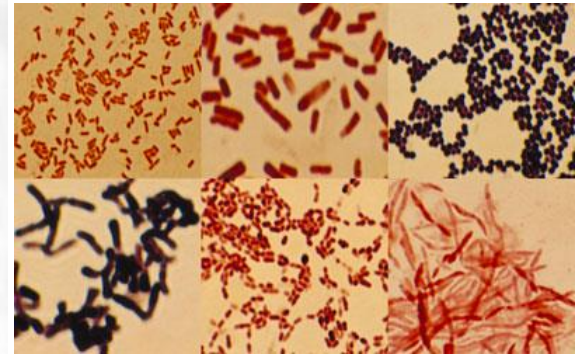


Proteus mirabilis



Pseudomonas aeruginosa

Bacteroides *Bacillus* *Enterococcus*



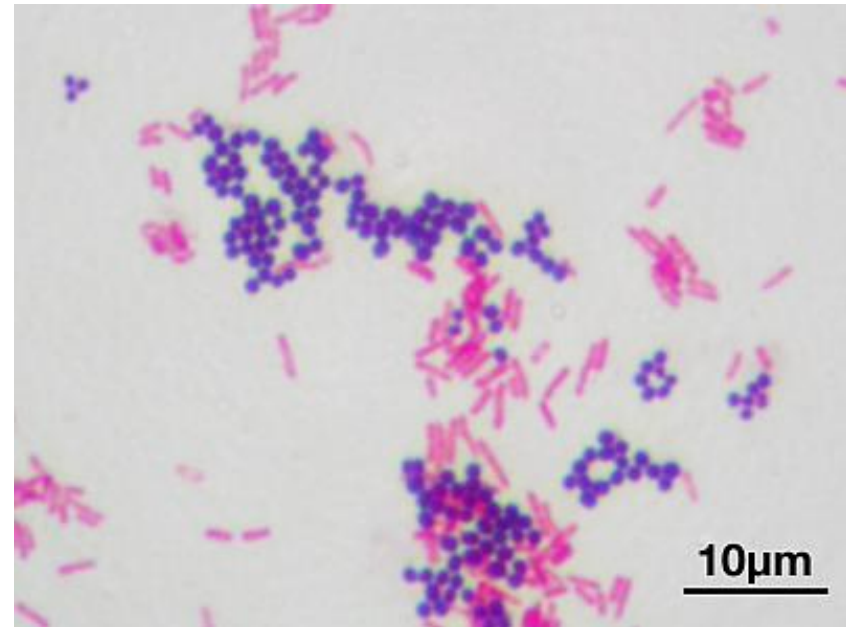
Bifidobacterium *anaerobic cocci* *Clostridium*

Identifikácia - základná

- Makroskopicky – na agaroch – tvary, veľkosť, farba a pod.
- Mikroskopicky – tvary, veľkosť, sporulácia, farbenie
- Selektívne pôdy s čiastočnou identifikáciou – MacConkey agar
- Chromogénne živné pôdy
- Diagnostické pôdy – Hajnov agar, XLD, Endov agar a pod

Farbenie podľa Gramma

- Rozdelenie baktérií na základe bunkovej steny na G+ a G-
- Základná diagnostika – rozdelí oddelenia *Gracillicutes* (G-) a *Firmicutes* (G+)
- Princíp: spočíva v ofarbení oboch typov buniek kryštálovou violeťou, preparát sa prekryje iódom, ktorý vytvorí s farbivom komplex, keďže G- bunk. steny obsahujú množstvo lipidov, tie sa vplyvom etanolu alebo acetónu rozpúšťajú a farbivo sa z G- buniek vyplavuje, preparát prekryjeme karbolfuchsínom a G- bunky sa farbja na červeno a G+ na modro-fialovo



Selektívne živné pôdy

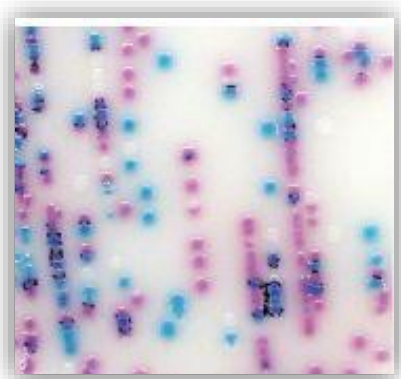
Baktérie selektujeme na pôdach na základe:

- Nutričného zloženia pôd
- Obsahu špecifických zložiek (ATB, žlč. soli...)
- Špecifické rastové látky (vit., rastové faktory, iné organizmy – *H. influenza*)
- Fyzikálne podmienky kultivácie (teplota, obsah O₂, čas, pH a pod.)
- Príklady: McC, MRS, SB, EA, M17, Rogosa, Baird Parker, VRBL...

Diagnostické agary

- sú špeciálne chromogénne živné pôdy pomocou ktorých dokážeme rozlíšiť rody a druhy baktérií na základe farebnej odlišnosti
- Obsahujú špeciálny indikátor, ktorý difunduje do kolónií a v závislosti od pH mení farbu kolónií
- Používajú sa v rýchlej diagnostike baktérií a iných MO
- Existuje mnoho druhov pre rôzne druhy a skupiny MO

Chromogenic-coliform agar



URI select 4 agar



Chromogenic Urine Agar IV : white colonies : *S.aureus*;
pink colonies : *E.coli*; turquoise blue colonies : *E.faecalis*;
dark blue colonies : *K.pneumoniae*

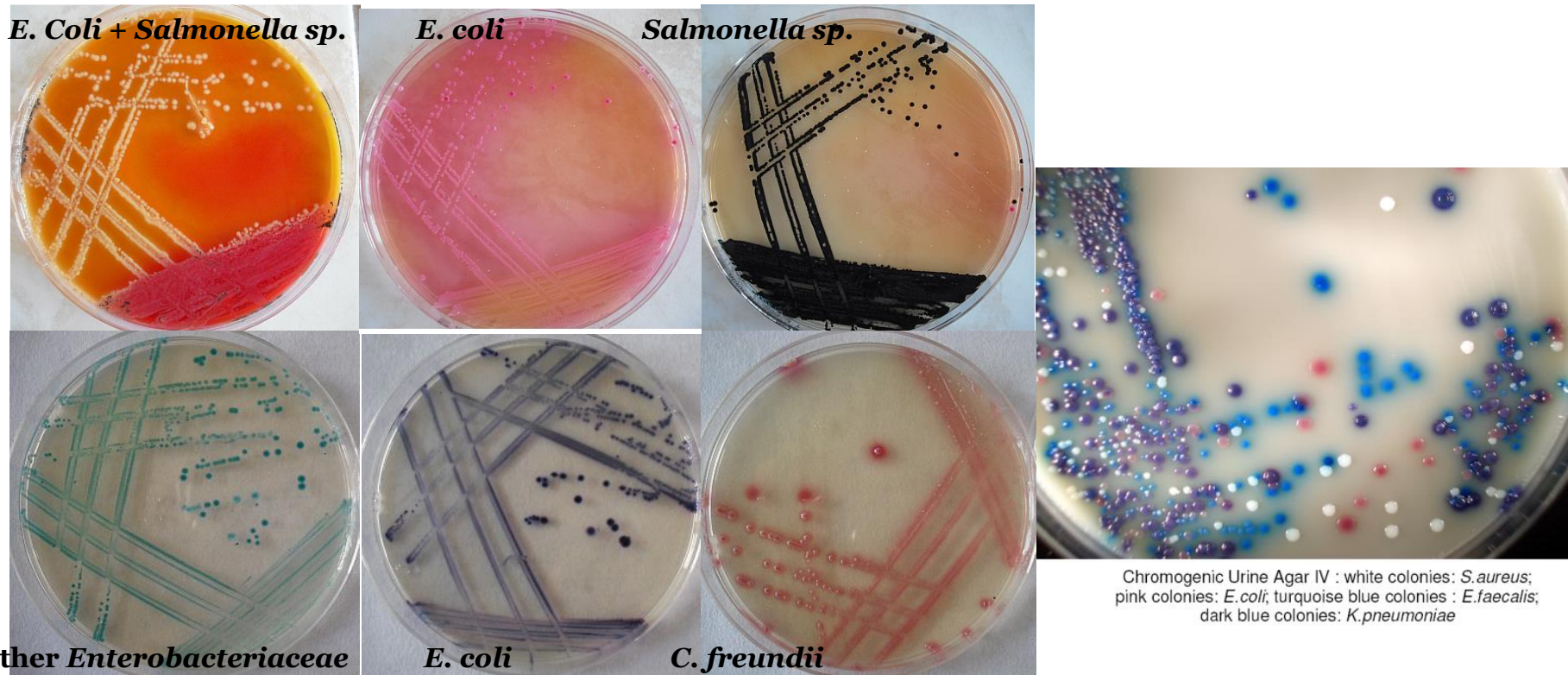
Diagnostické agary

- Niektoré zo selektívnych ž.p. sú z časti aj diagnostickými
- Príklady:

Endov agar – *E. coli* – kovovo-lesklé kolónie (pozor !!! aj *H. alvei*)

MacConkey agar – rozdeľuje za základe fermentácie laktózy (L+, L-)

TSI agar (viac biochemických ukazovateľov – H₂S, plyn, cukry)



Biochemické testy - Hajnov agar (TSI)



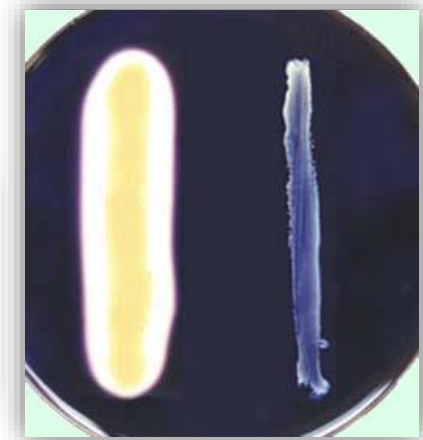
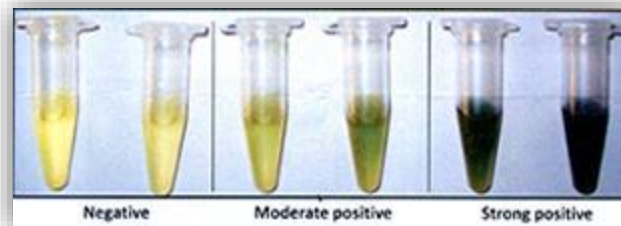
Biochemické testy - Hajnov agar (TSI)

Hajnov agar – triple sugar iron agar (TSI)

- Je agar určený pre identifikáciu baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* na základe schopnosti baktérií redukovať síru a fermentovať cukry
- Obsahuje tri typy cukrov (glukózu, laktózu a sacharózu), sulfáty železa a fenolovú červeň ako indikátor
- Fermentácia cukrov – fermentujúce (z cukrov tvoria kyseliny, pH klesá a farba agaru sa nemení)
 - nefermentujúce (využívajú peptón, z ktorého vzniká amoniak, pH stúpa a farba agaru sa mení zo žltej na červenú)
- Tvorba CO₂ – baktérie tvoriace CO₂ pretrhávajú agar
 - baktérie, ktoré netvoria CO₂ agar netrhajú
- Tvorba H₂S – ak baktérie tvoria H₂S, agar sa sfarbuje na čierne
 - baktérie, ktoré netvoria H₂S agar nesfarbujú

Biochemické testy

- Biochemické rozdiely medzi baktériami sú jedným z najdôležitejších určovacích znakov pri identifikácii baktérií
- Medzidruhovú variabilitu – variabilitu v metabolizme
- Používajú sa hlavne pri čeladi *Enterobacteriaceae*, rodu *Enterococcus* a iných
- Pomocou nich sa sledujú rôzne biochemické zmeny v médiách a agaroch
- Napr. tvorba H_2S – sfarbenie do čiernej, tvorba plynu (CO_2), fermentácia rôznych typov cukrov (zmena pH = zmena farby), enzymatický rozklad škrobu, močoviny a pod.



Biochemické testy - sety

Enterotest 24 – kompletná súprava biochemických testov v mikroplatničkách pre identifikáciu baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* – mikroplatnička obsahuje 24 biochemických testov

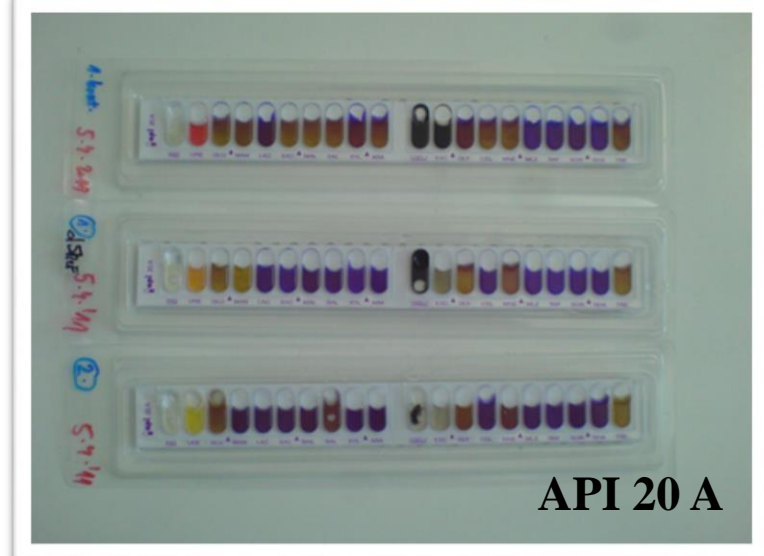
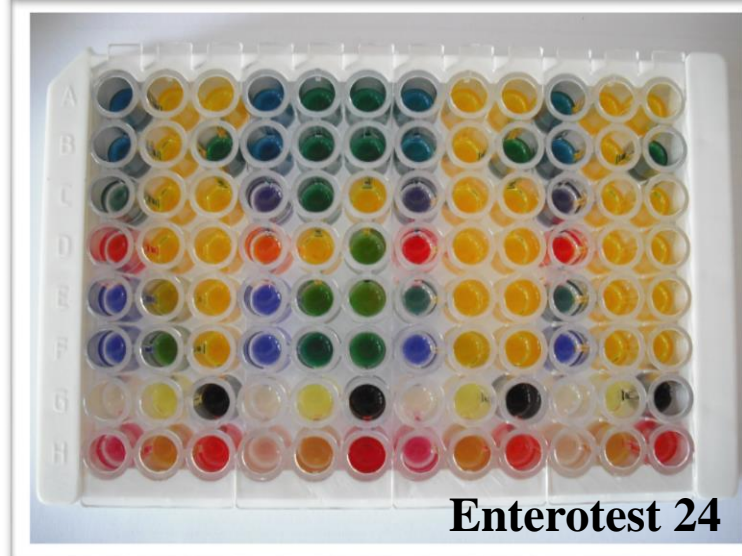
- Potreba čistých kultúr
- 24 hodinové kultúry o denzite 1 McF^o vo fyziologickom roztoku
- Kultivácia na mikroplatničke 24 hodín
- Po kultivácii odčítať farebné zmeny podľa referenčnej tabuľky
- Výsledky vyhodnotíme na počítači s pomocou programu na identifikáciu baktérií TNW 7.0 Lite software

Encoccus test – je súprava biochemických testov pre identifikáciu baktérií z rodu *Enterococcus* sp. – mikroplatnička obsahuje 8 biochemických testov

Anaero test – je súprava biochemických testov pre identifikáciu anaeróbných baktérií

- Taktiež existuje mnoho biochemických súprav pre identifikáciu rôznych skupín baktérií (API 50 CH – *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., API 20 A – anaeróbné baktérie, RapidID 32 A – rýchle do 4 hodín)

Biochemické testy - sady

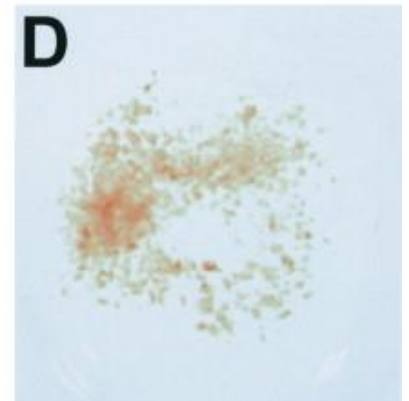
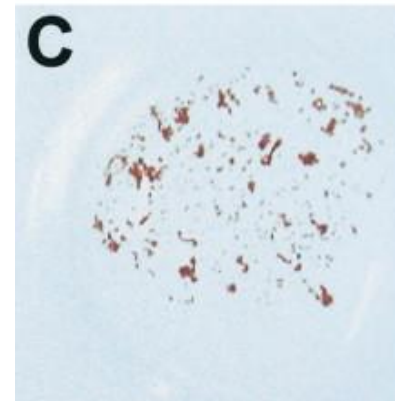
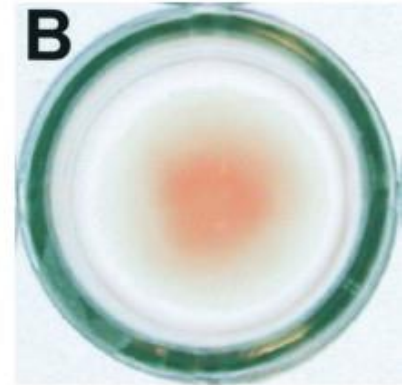
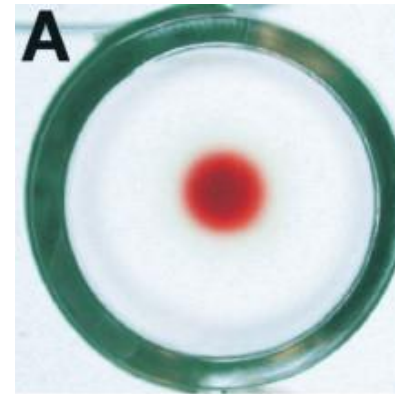
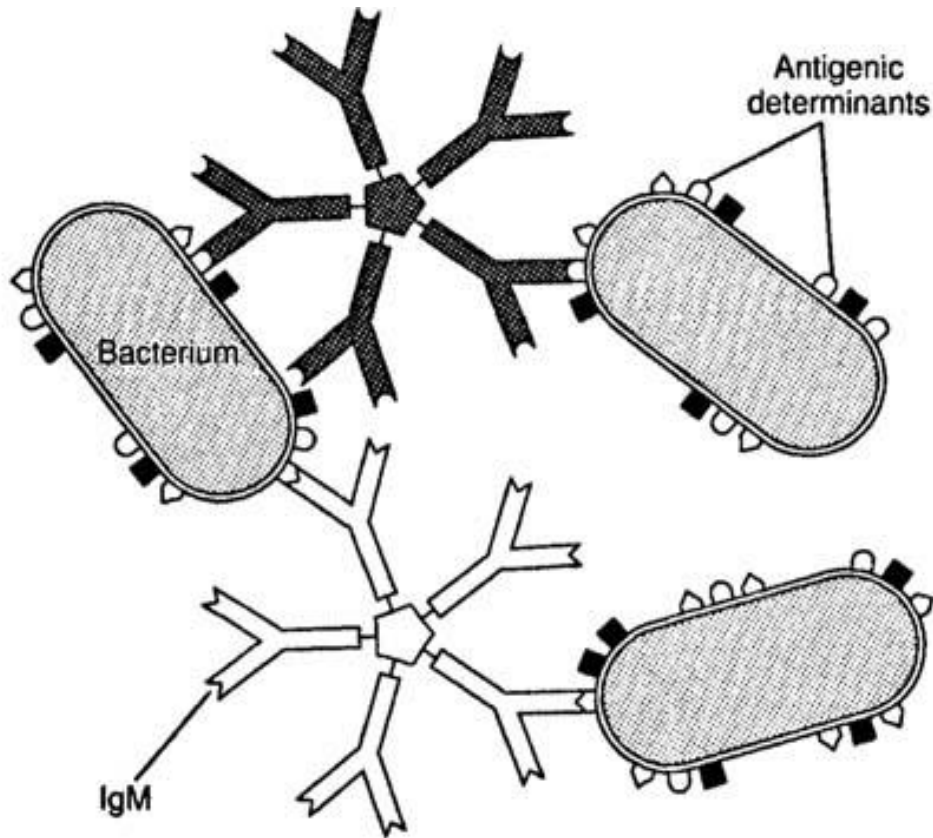


Identifikácia - biochemická

- Cukrová rada – *Enterobacteriaceae*
- Enterotest 24, Encoccus test, Anaerotest, Streptotest, Staphytest, candida test a pod.
- Vitek 2 system -



Diagnostika - serotypizácia u *Enterobacteriaceae* (G-)



Vitek 2 system

- Vitek 2 system je prístroj na identifikáciu baktérií a zároveň u nich testuje antibiotickú citlivosť
- Funguje na princípe biochemických testov, ktoré sú umiestnené v mikroplatničkách
- Rýchlosť identifikácie je obmedzená biochemickými reakciami v mikroplatničke (okolo 10 hodín)



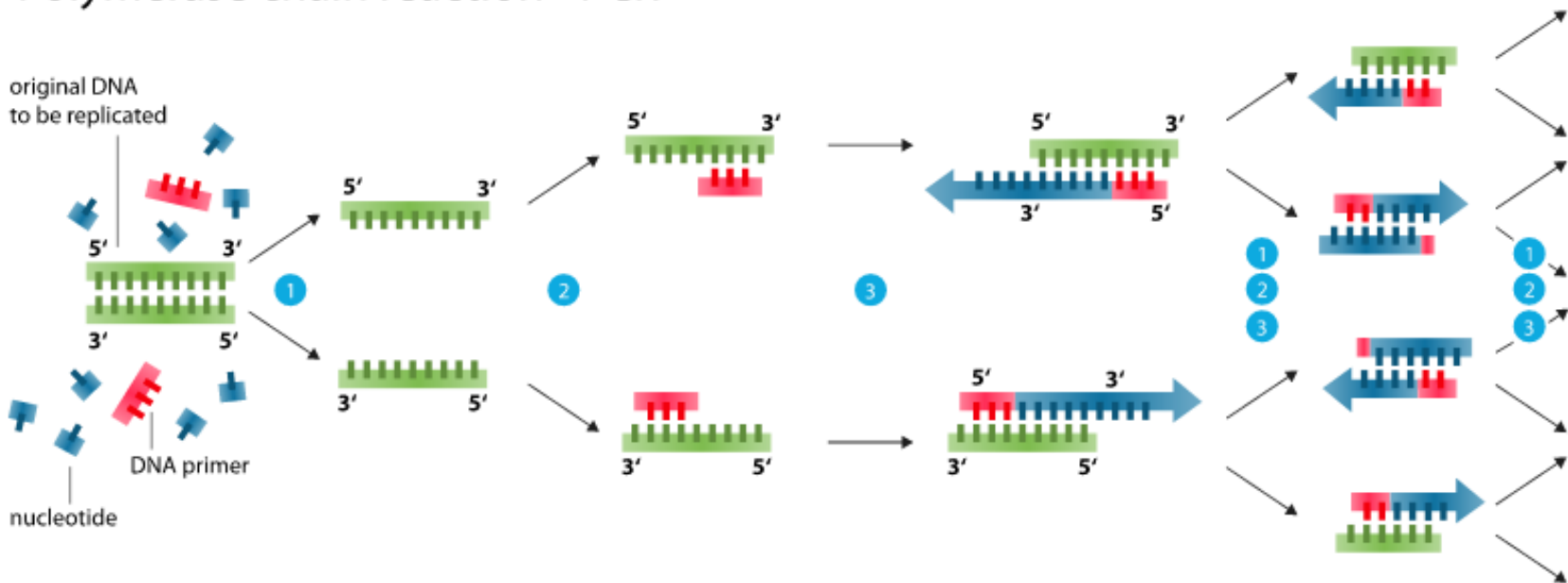
Možnosti identifikácie

- Genetická identifikácia – izolácia DNA, PCR reakcia, gélová elektroforéza, vizualizácia gélu, alebo priamo z PCR na sekvenáciu, porovnanie s databázou sekvencií
- Moderná multi-biochemická identifikácia – mnohé biochemické testy v mikro-platniach vyhodnocované počítačom
- Fingerprintová identifikácia na základe zloženia bielkovín – izolácia proteínov, detekcia proteínov na základe molekulovej hmotnosti a porovnaním s databázou hmotnostných spektier

Identifikácia - molekulárna

- PCR – 16S RNA, 23S DNA – nedostatočná – potreba celého genómu

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

Izolácia DNA - prvý krok



- Súčasť malej podjednotky ribozómu 30S – ináč nazývaná aj SSU rRNA
- Má približne 7000 báz
- Má však svoje limity – dokáže odlíšiť predkov, nie však v časovej následnosti, 97 % určuje podobnosť v rode, avšak existujú baktérie ako *Thermospóra bispóra* – ktorá má viacero kópií 16S RNA s rozdielnosťou 6,4%, alebo podobnosť niektorých druhov v 16S RNA
- Do úvahy prichádza sekvenovať celé genómy
- Bežné izolačné metódy – kombinácia extrakcie a zrážania DNA (fenol-chloroformová metóda) alebo izolácie pomocou kolóniek

PCR metóda - druhý krok

- PCR – polymerázová reťazová reakcia (Mullis, 1984)
- Je to metóda molekulárnej biológie, ktorá slúži na amplifikáciu (zmnoženie) molekuly DNA pomocou DNA-polymerázy
- Súčasti PCR reakcie: templát, primery, dNTP, Taq-polymeráza, PCR pufor + MgCl₂, deionizovaná sterilná voda
- Termocykler – prístroj určený výlučne pre PCR reakcie, ktorý dokáže rýchlo meniť teplotu vzoriek, ktorá je potrebná pri samotnej PCR reakcii

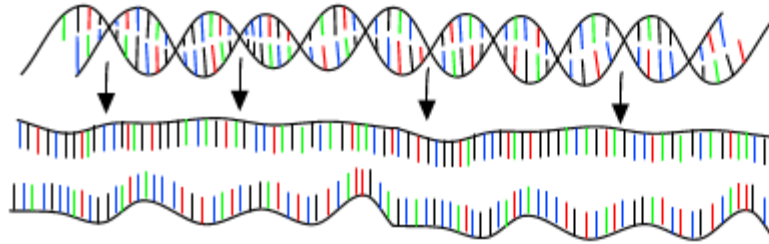
Priebeh PCR metódy

- PCR reakcia pozostáva z troch cyklicky sa opakujúcich krokov (20 – 30 krát)
1. Denaturácia – vplyvom tepla ($>90^{\circ}\text{C}$) templát denaturuje
 2. Anelácia – teplotným poklesom ($37\text{-}65^{\circ}\text{C}$) nastáva hybridizácia primerov na templátovú DNA
 3. Polymerizácia – zvýšením teploty na 72°C Taq-polymeráza syntetizuje nové vlákno z dNTP
 4. Záverečná polymerizácia – tento krok prebehne len raz (slúži na "dobehtutie" všetkých polymerizačných reakcií, ktoré ešte prebiehajú)

Pomocou PCR reakcie sa dá získať dostatočné množstvo kópií DNA alebo jej úsekov na ďalšiu prácu s DNA (napr. pre elektroforetický gél)

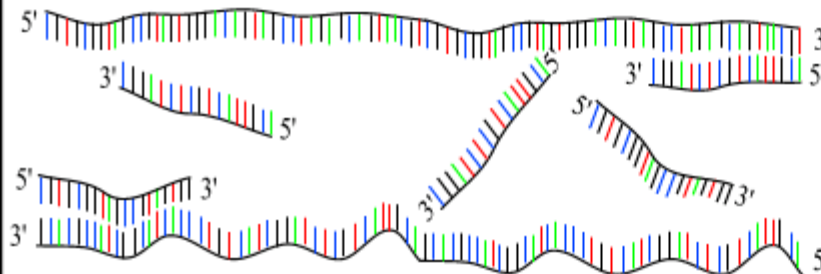
PCR : Polymerázová reťazová reakcia

30 - 40 cyklov v 3 krokoch



1. krok : denaturácia

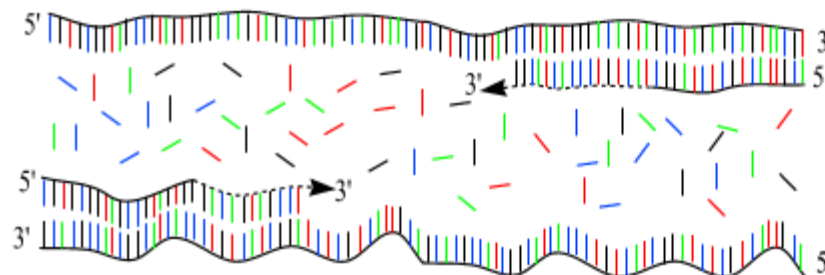
1 minútu 94 °C



2. krok : hybridizácia

45 sekúnd 54 °C

forward a reverse primery



3. krok : predĺžovanie

2 minúty 72 °C

iba dNTP nukleotidy

- **princíp:**

Molekuly NK (DNA, RNA) sa v elektrickom poli delia podľa náboja – využíva sa schopnosť nabitých častíc pohybovať sa v el. poli ku opačne nabitým elektródam.

- **nosič:**

agaróza



GÉL

- pre DNA

v tlmivom roztoku:

Tris-acetátový (TAE)

Tris-borátový (TBE)

Tris-fosfátový (TPE)

polyakrylamid

- pre bielkoviny

Gélová elektroforéza - ELFO

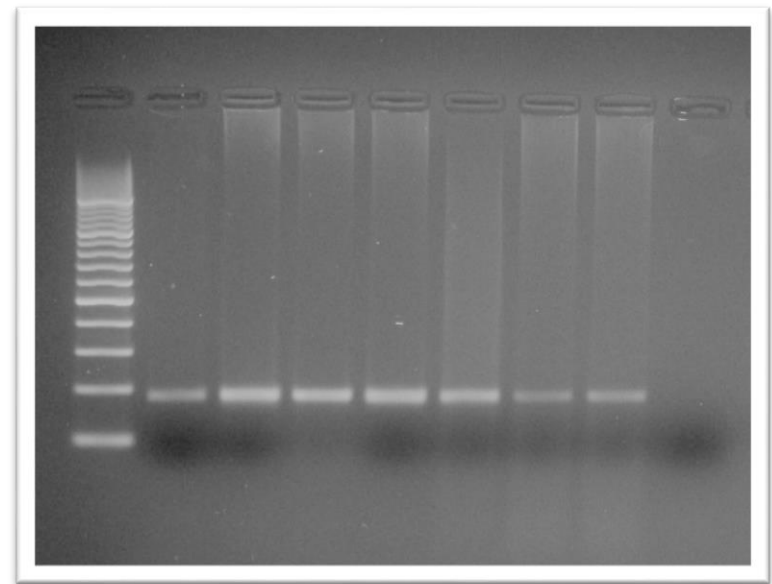
Vizualizácia DNA v géle

- pod transluminátorom (UV 300-360 nm)
- pomocou interkalačných farbív, ktoré sa viažu s prítomnými bázami
- napr. etídium-bromid, GoldView, SYBR-Green

- vyhodnotenie veľkosti fragmentov – podľa štandardov (fragmentov DNA o známej dĺžke)

Vizualizácia PCR produktu po skončení PCR reakcie v termocykleri na 2 % agarózovom géle

- L** – DNA Ladder (marker)
1 až 7 - PCR produkt (185 bp)
8 – negatívna kontrola (Master mix bez DNA)



Sekvenovanie

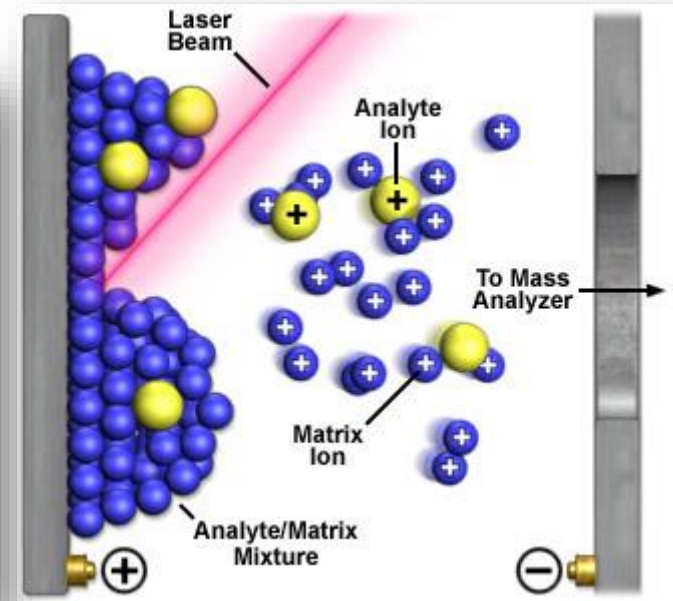
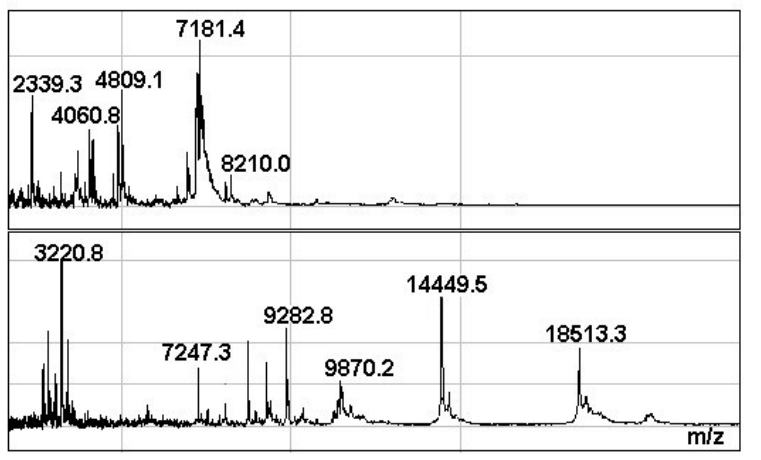
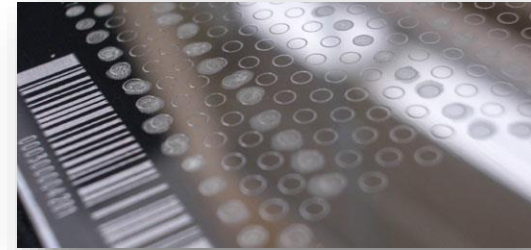
- Replikované úseky genetického materiálu z PCR putujú priamo na sekvenovanie
- Sekvencie zo 16S RNA sú priamo porovnávané z databázou
- Podobnosť alebo zhoda sekvencií je vyhodnotená v percentách

Web BLAST



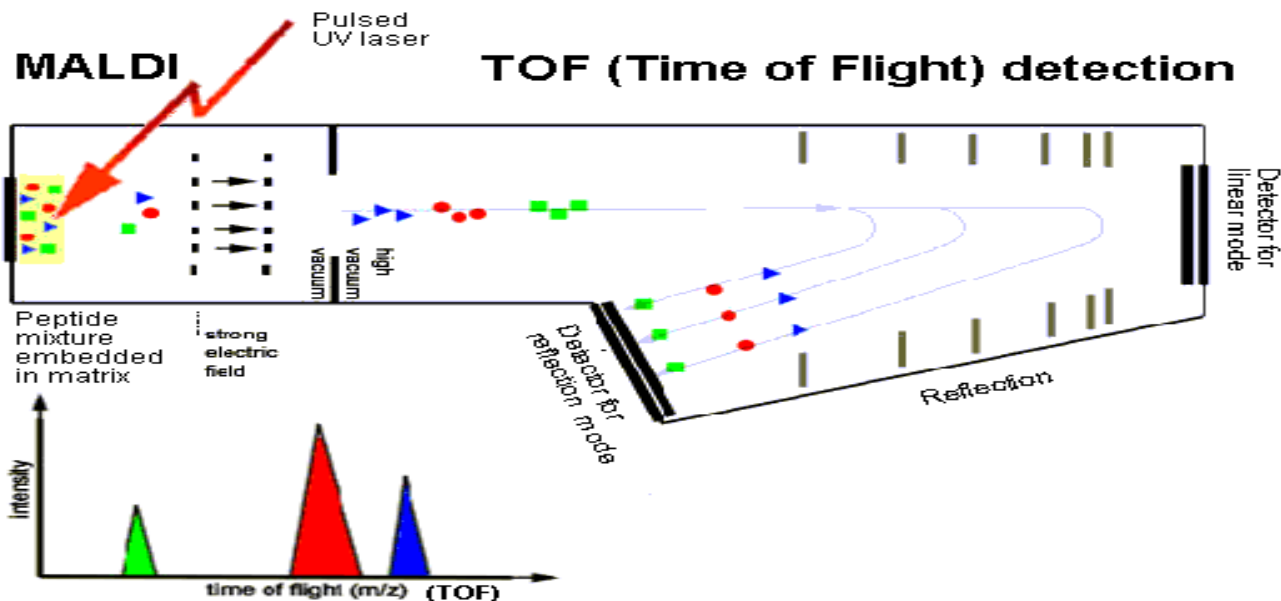
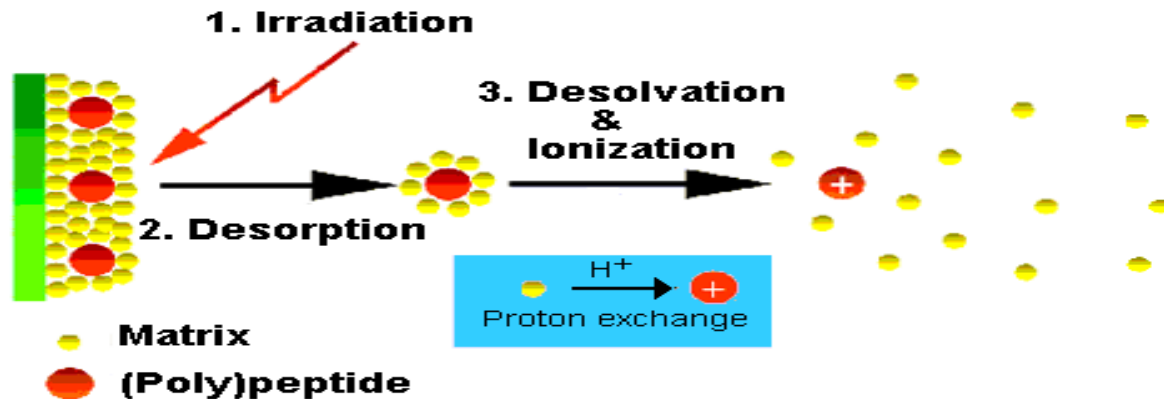
Maldi-TOF Mass Spectrofotometry

- Maldi – TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation Time-of-light)
- Rýchla identifikácia bielkovín (10 s.)
- Na základe bielkovinového zloženia, dokáže podľa databázy identifikovať druh baktérie



Identifikácia - molekulárna

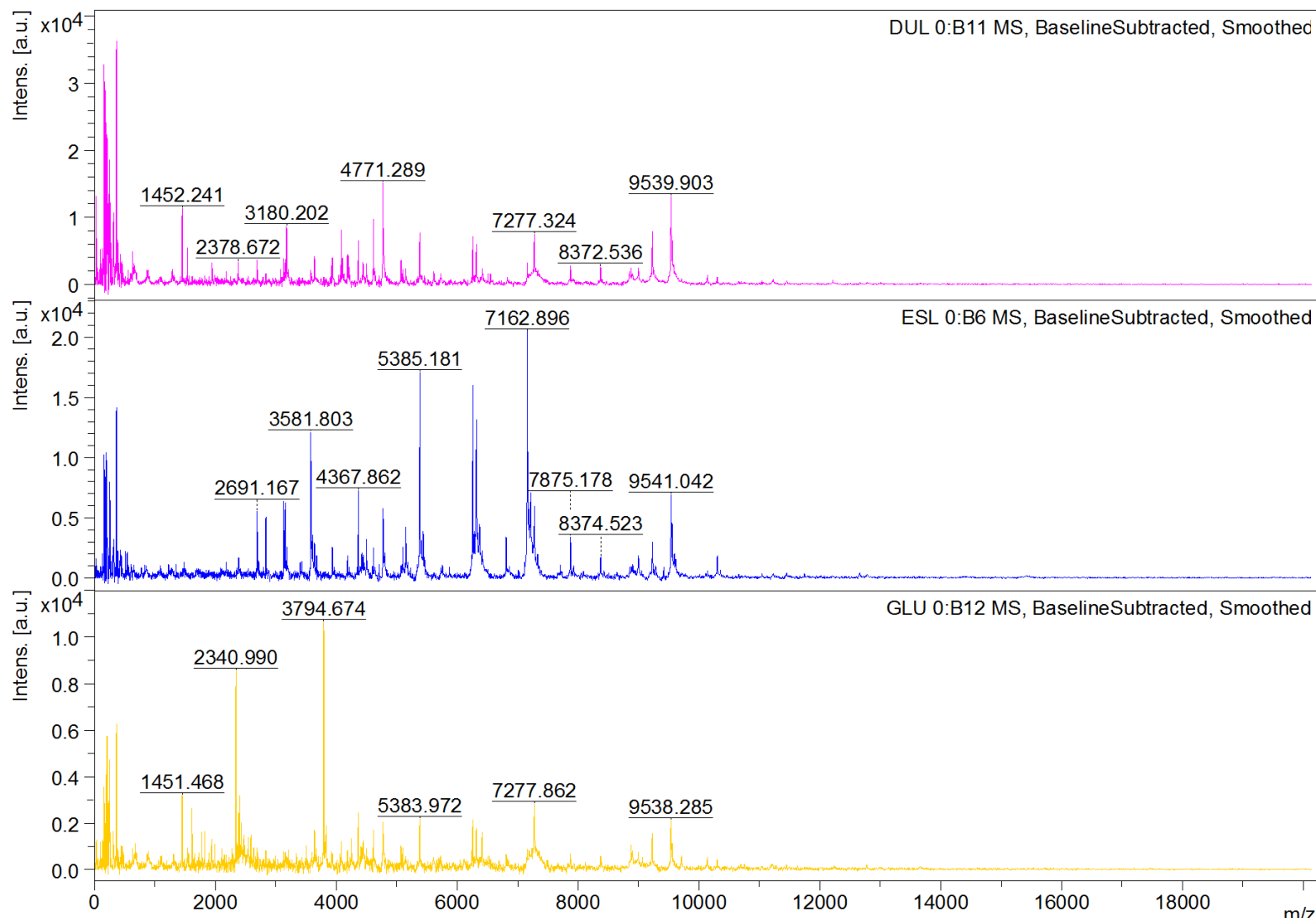
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)



Maldi-TOF MS

- Čistenie izolátov – pomocou etanolu a vody
- Izolácia bielkovín z baktérií – silná leptavá kyselina (kys. mravčia) a extrakčné činidlo (acetonitril) na bielkoviny (ribozomálne bielkoviny)
- Zmiešanie bielkovín z matricou (kys. škoricová)
- Kryštalizácia
- Ostreľovanie laserom – nabitie (ionizácia) matrice – odovzdanie náboja bielkovine – prelet cez detektor (TOF) – meranie rýchlosti preletu, detekcia hmotnosti bielkovín
- Automatické porovnávanie bielkovinového spektra s databázou – identifikácia na úrovni druhu

Maldi-TOF MS - spektrá



Identifikácia - molekulárna

