Ograničenja konvencionalne mikrobiološke dijagnostike

- **Izolacija i identifikacija mikroorganizama**
  - Kod određenih mikroorganizama potreba za specijalnim podlogama
  - Dugo vreme kultivisanja
  - Određeni mikroorganizmi ne mogu se izolovati na hranljivim podlogama – rikecije, hlamidije i virusi.
  - Veoma zarazni mikrorganizmi odnosno uzročnici zoonoza
- **Detekcija antigena**
  - Problem detekcije mikroorganizma prisutnih u malom broju
  - Zavisi od uzimanja uzoraka
- **Serološka ispitivanja - reakcije antigena i antitela**
  - Problem rana faza infekcije

Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

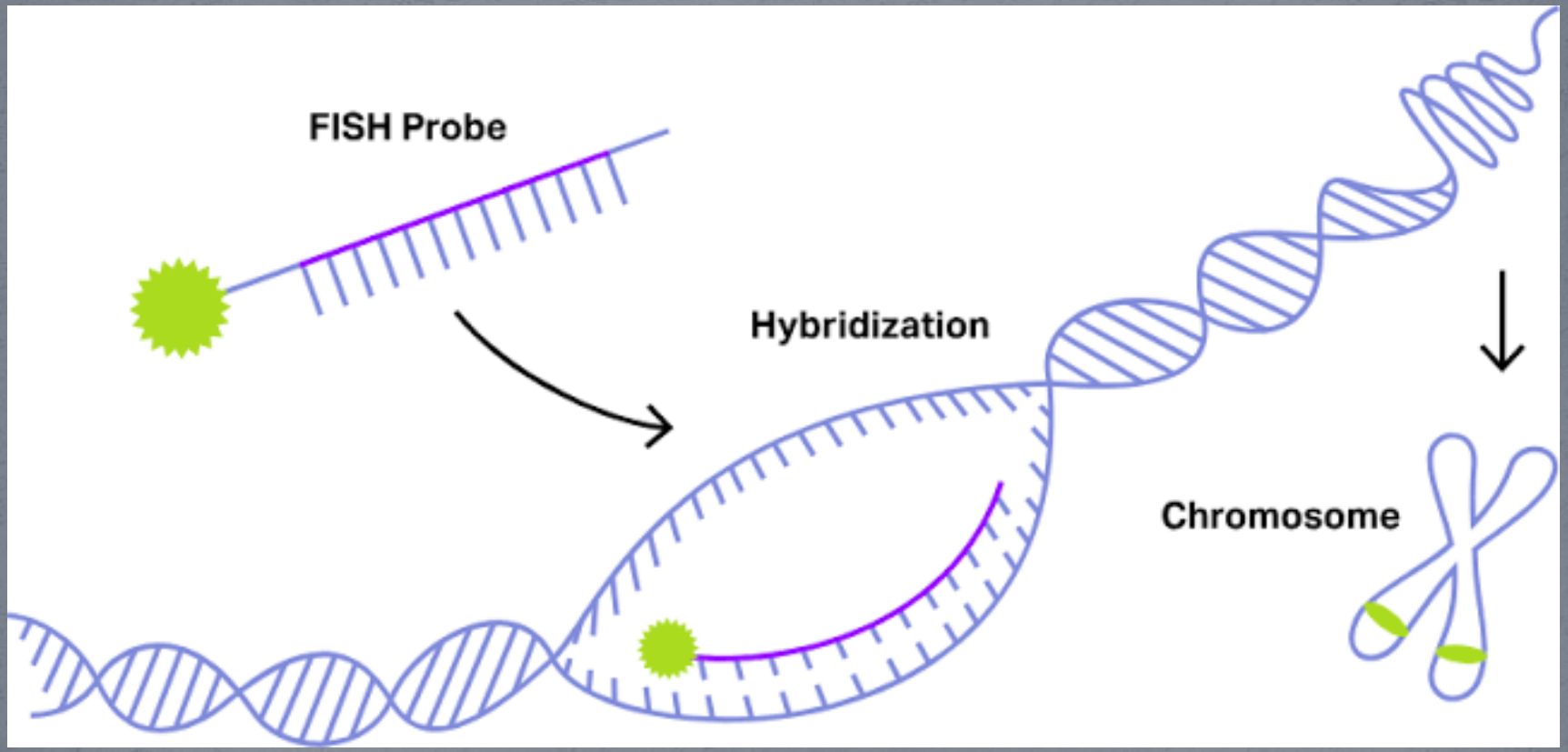
- Dobra metoda mikrobiološkog ispitivanje treba da se odlikuje adekvatnom:
  - **Senzitivnošću** – otkriva uzročnika i u veoma malom broju
  - **Specifičnošću** – pozitivni rezultati samo prema datom uzročniku
  - **Jednostavnošću** – lako se izvodi i nije skupa za rutinsku dijagnostiku

Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- **Genske probe** – primenjuju se kratki, jednolančani fragmenti nukleinskih kiselina (DNK ili RNK) poznate sekvence koji se koriste za otkrivanje specifičnih, komplementarnih genetskih sekvenci u uzorku.
- One funkcionišu po principu **hibridizacije** - sparivanja baza - adenin sa timinom/uracilom, guanin sa citozinom.
- Kako bi se njihovo vezivanje moglo uočiti, **genske probe se uvek obeležavaju npr. fluorescentnim bojama ili radioaktivnim izotopima.**

Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- Genske probe



Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- **Genske probe**

1. **Denaturacija**: Uzorak DNK koji se ispituje se zagreva kako bi se dvostruki lanac razdvojio na dva pojedinačna lanca.

2. **Dodavanje probe**: U uzorak se dodaje obeležena genska proba.

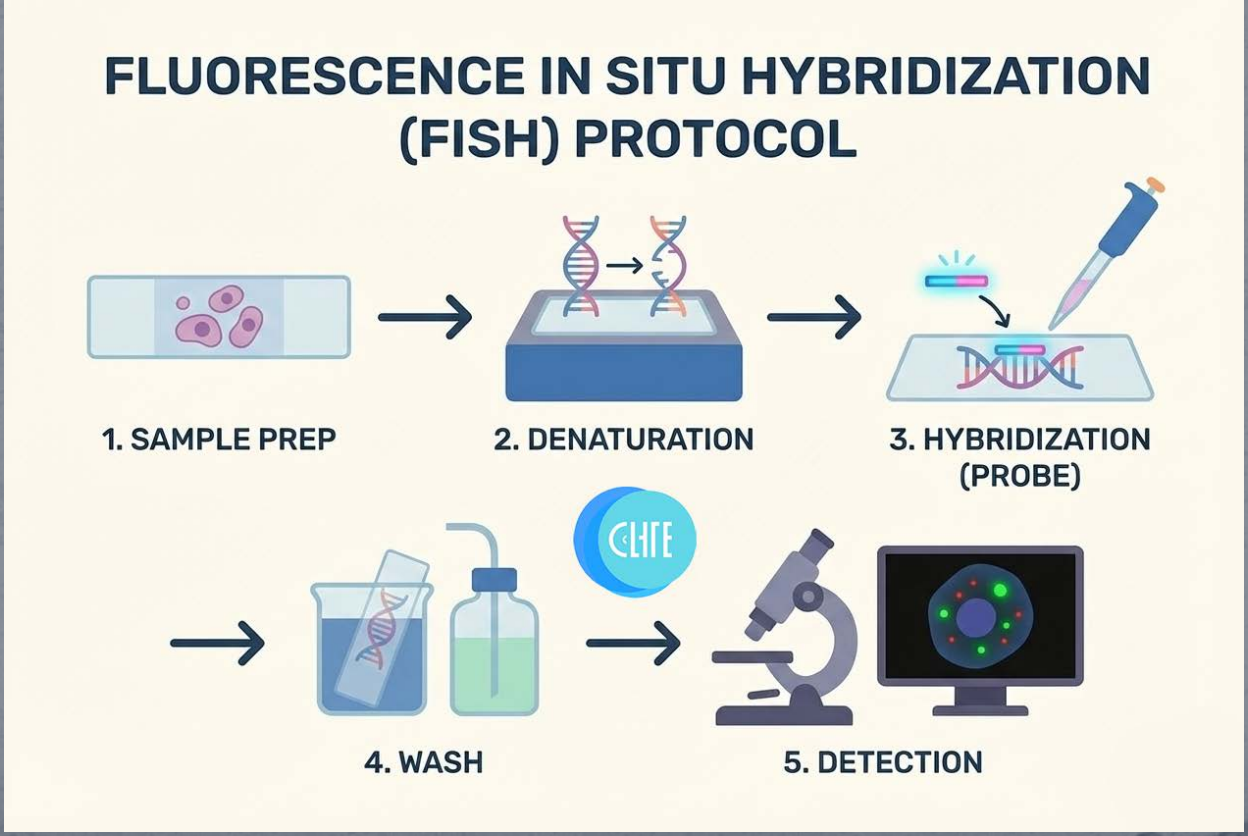
3. **Hibridizacija**: Ako u uzorku postoji gen ili sekvenca koju tražimo, proba će se precizno vezati za nju.

4. **Detekcija:** Nevezane probe se ispiraju, a preostali signal (npr. svetlucanje pod UV svetlom, fluorescencija) potvrđuje prisustvo traženog gena.

Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

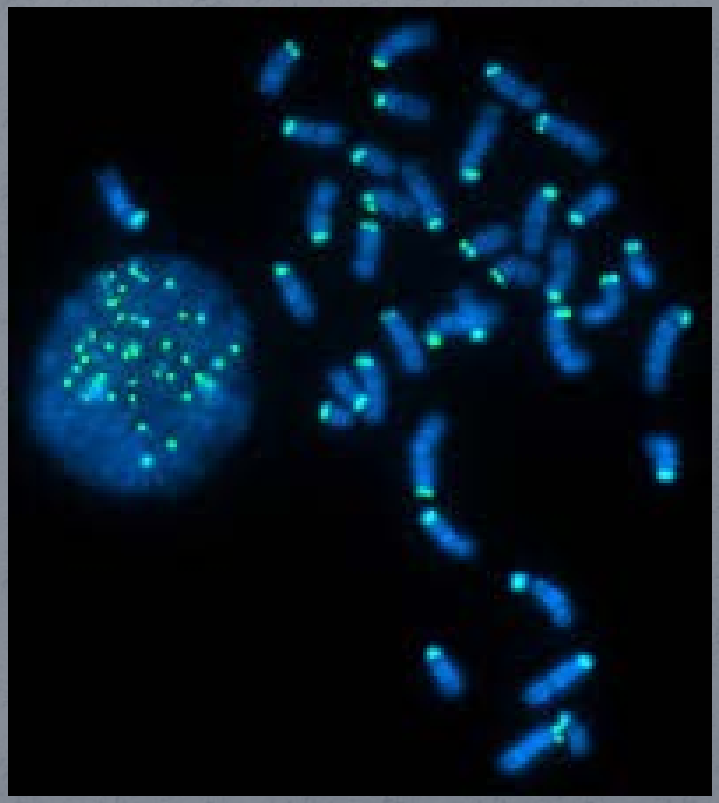
- **Genske probe**

FISH (Fluorescentna in situ hibridizacija) - Probe svetle pod mikroskopom i detektuju odgovarajući gen direktno u ćeliji.



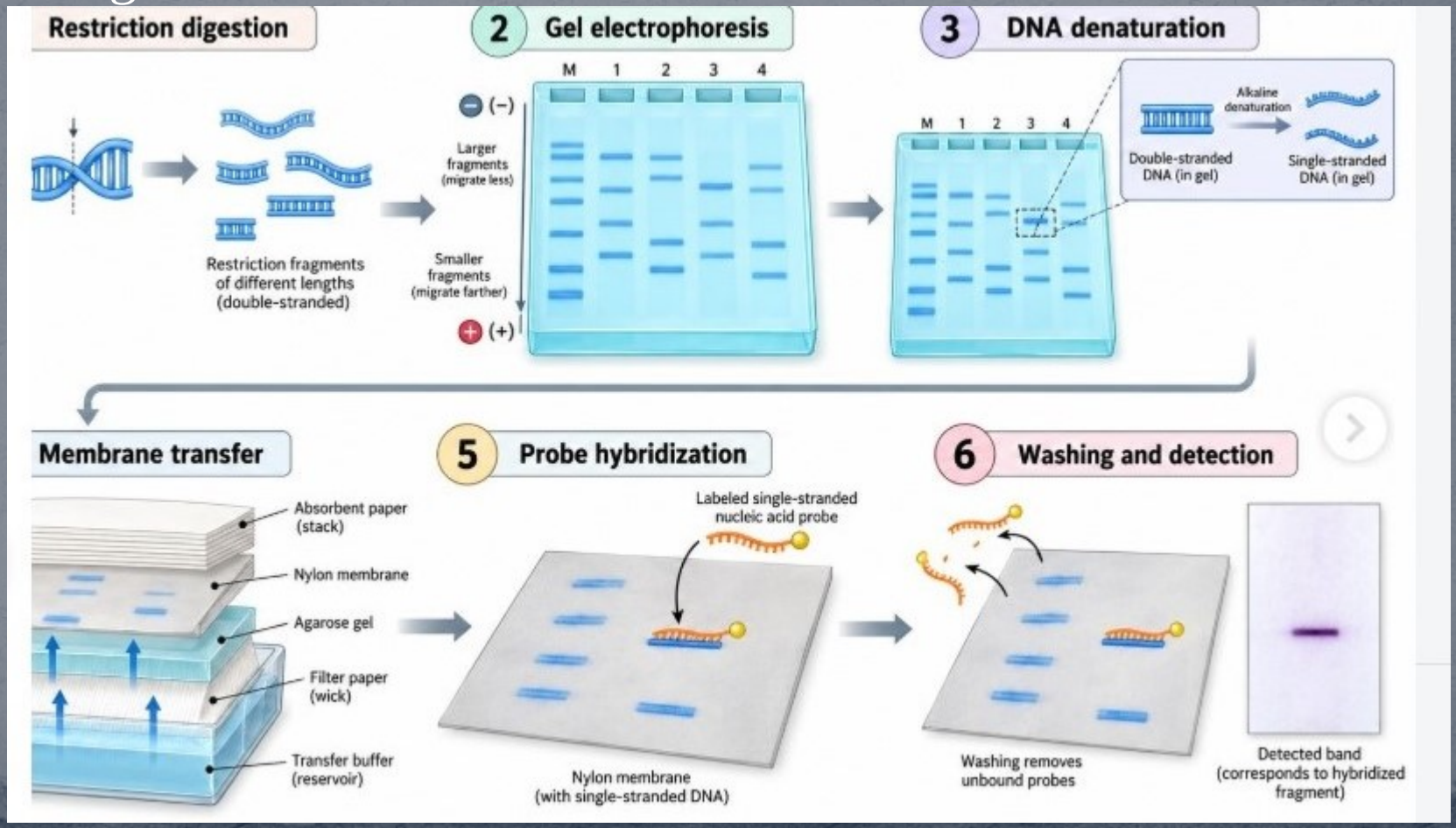
Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- **Genske probe FISH** - Fluorescentna in situ hibridizacija



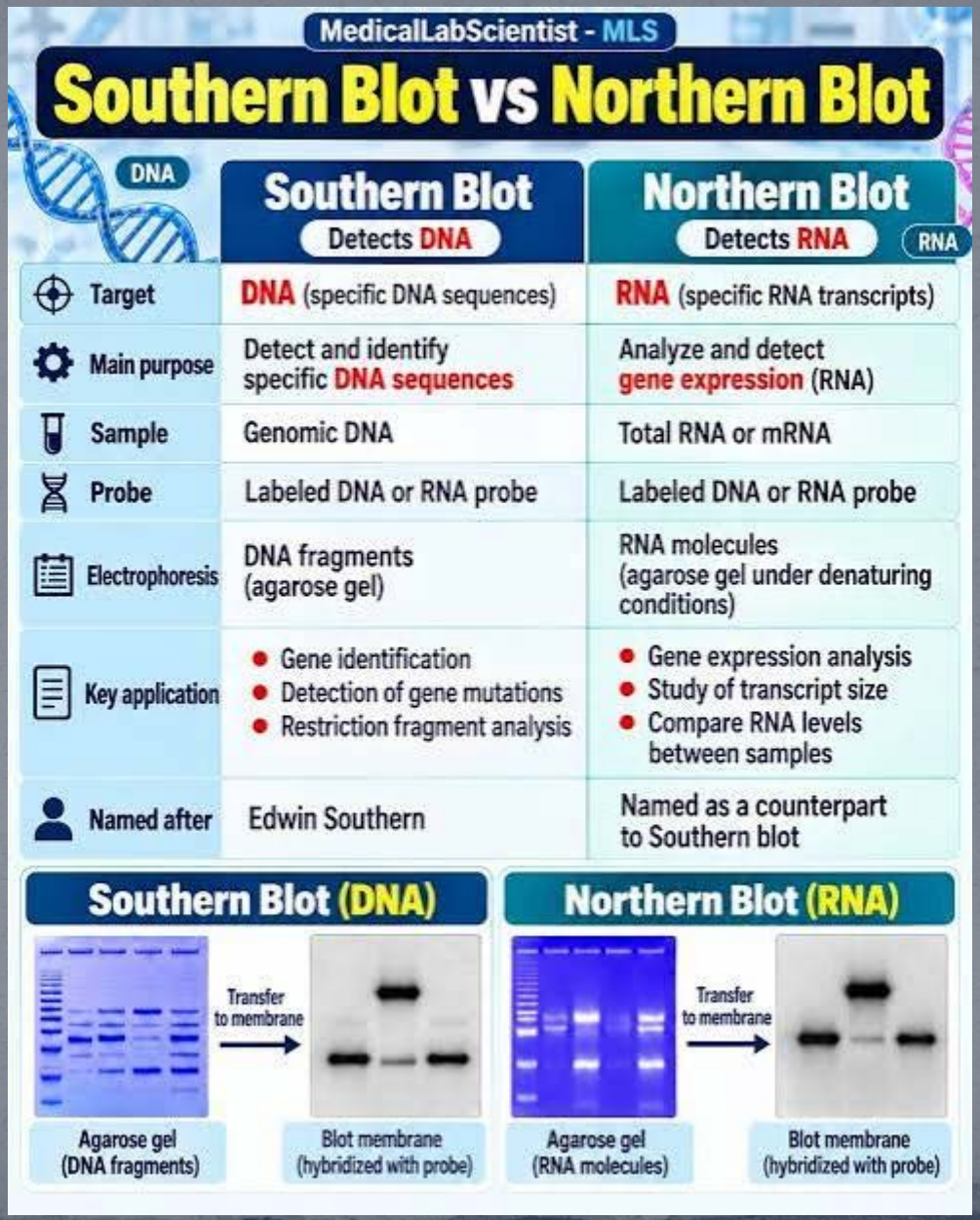
Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- **Genske probe - Southern Blotting** - Koristi probe za identifikaciju specifičnih DNK sekvenci u velikom i složenom uzorku genoma.



Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

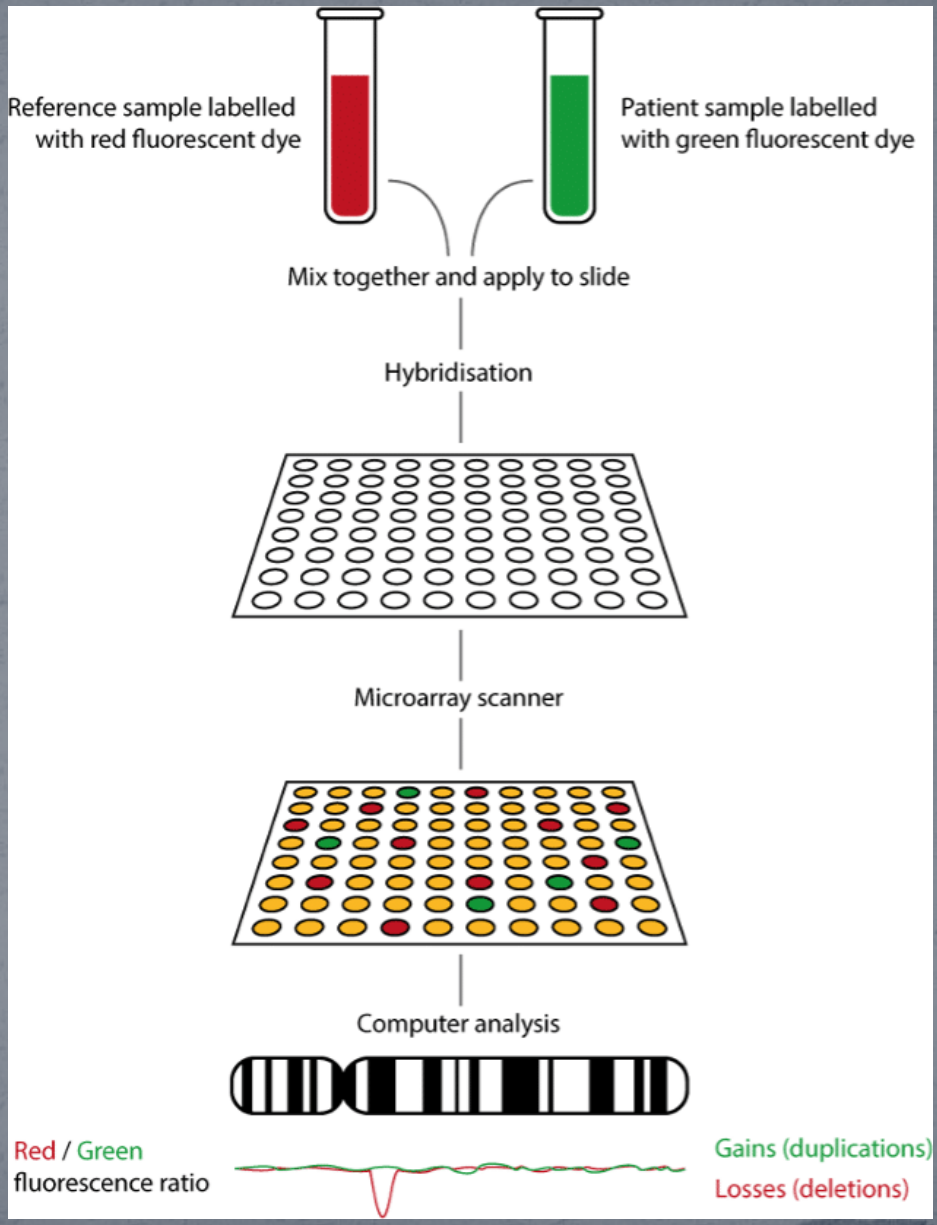
- Genske probe - Southern Blot i Northern Blot.



Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

DNK čipovi (Microarray)

Hiljade različitih probi postavljenih na malu staklenu pločicu, što omogućava analizu hiljada gena istovremeno.



Primena tehnike molekularne biologije u mikrobiološkoj dijagnostici

- **PCR – polymerase chain reaction – lančana reakcija polimeraze** – umnožavanje specifične sekvence DNK u orgomnom broju kopija u kratkom vremenskom periodu
  - Godine 1983. Kary Mullis je pronašao PCR metodu 1983 godine a 1993 dobio Nobelovu nagradu za hemiju



PCR – lančana reakcija polimeraze

- Klasični PCR (lančana reakcija polimeraze) je metoda kojom se određeni segment DNK umnožava in vitro, kroz ponavljane temperaturne cikluse.
- Ciljni segment određuju dva prajmera koji se vezuju za njegove granične regione na suprotnim lancima DNK.
- Za reakciju su potrebni: matrična DNK, dva prajmera, termostabilna DNK polimeraza (npr. Taq polimeraza), dezoksiribonukleotidi (dNTP), pufer i joni Mg^{2+}.

PCR – lančana reakcija polimeraze

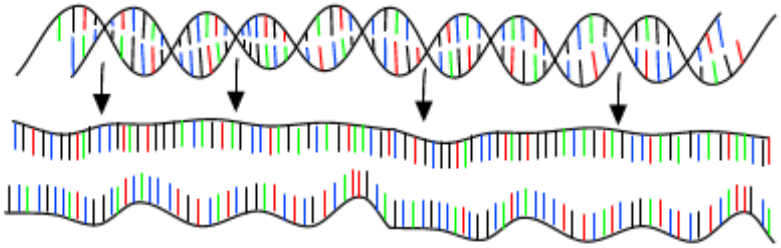
Faza	Uobičajena temperatura	Šta se događa
Denaturacija	94–98 °C	Razdvajaju se dva lanca DNK.
Vezivanje prajmera – hibridizacija (*annealing*)	Približno 50–65 °C	Prajmeri se vezuju za komplementarne sekvence na matričnoj DNK. Temperatura zavisi od njihovih osobina.
Elongacija – produžavanje lanaca	Oko 72 °C za Taq polimerazu	Polimeraza produžava prajmere dodavanjem nukleotida i sintetiše nove lance u smeru **5′ → 3′**.

PCR – lančana reakcija polimeraze

- Po završetku reakcije, PCR produkti se najčešće razdvajaju elektroforezom u agaroznom gelu i vizualizuju bojom za DNK.
- Dobijena traka poredi se sa markerom veličine; traka očekivane veličine ukazuje na prisustvo ciljnog produkta, uz odgovarajuće rezultate pozitivne i negativne kontrole.
- Sama veličina trake nije konačna potvrda identiteta sekvence.

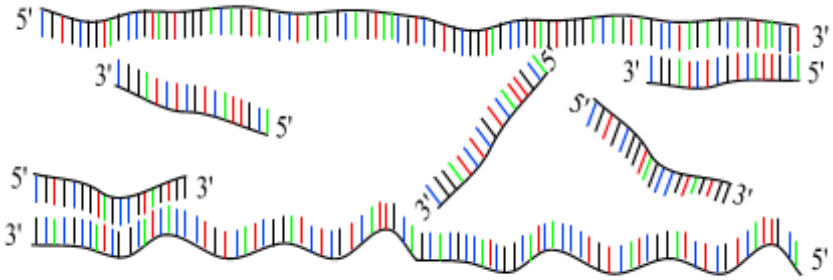
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

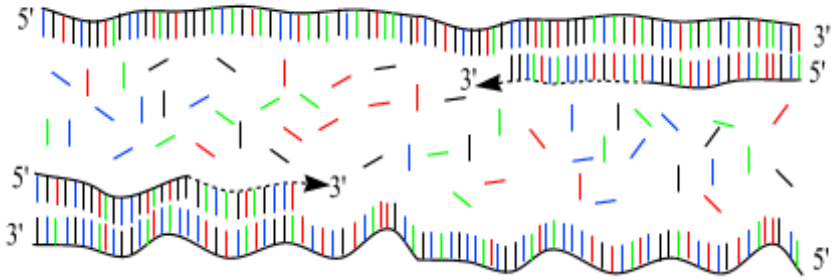
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

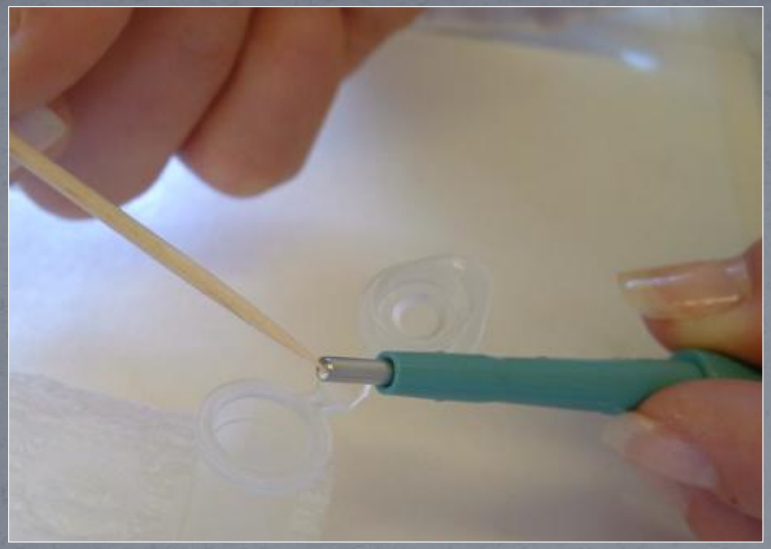


Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

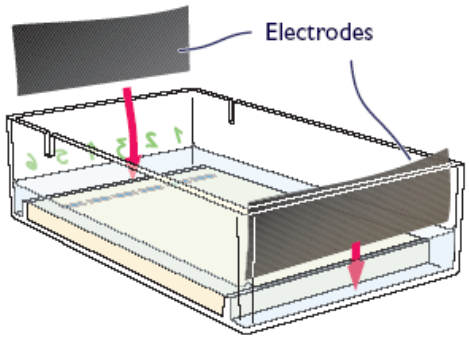
only dNTP's

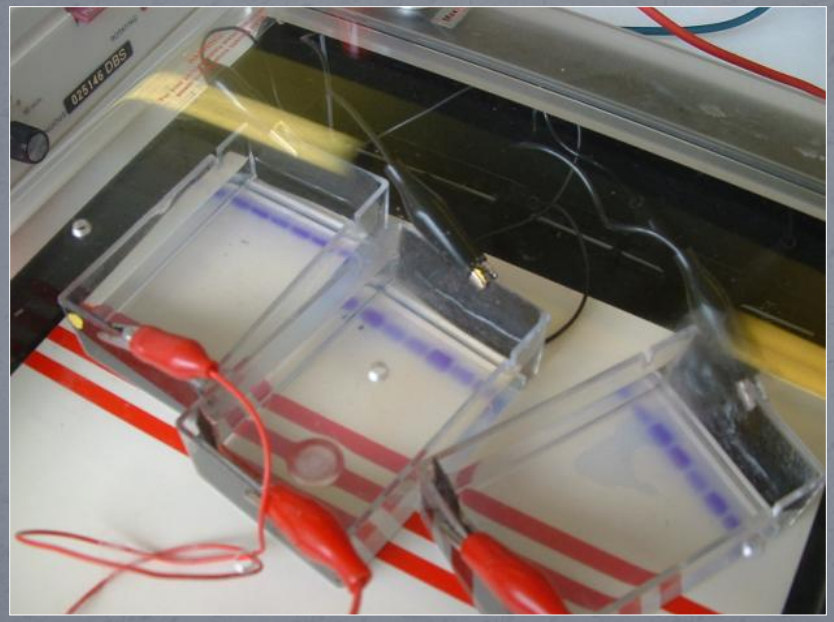
(Andy Vierstraete 1999)









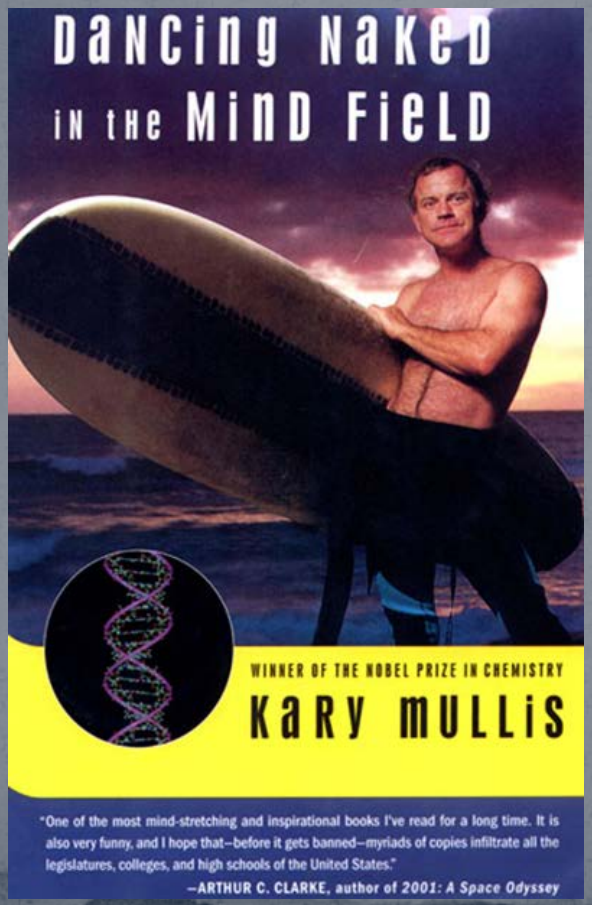


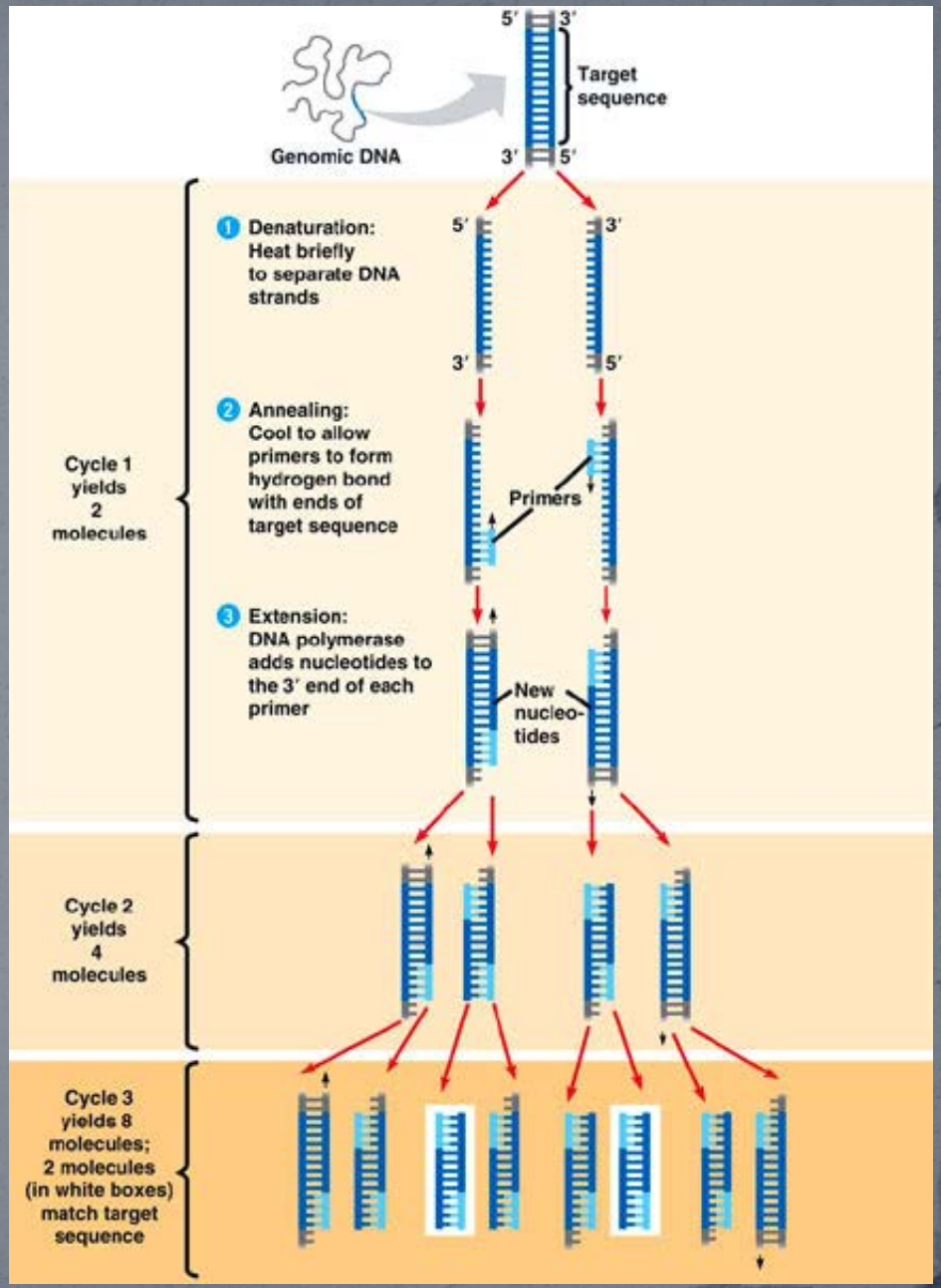
1 2 3 4 5 6



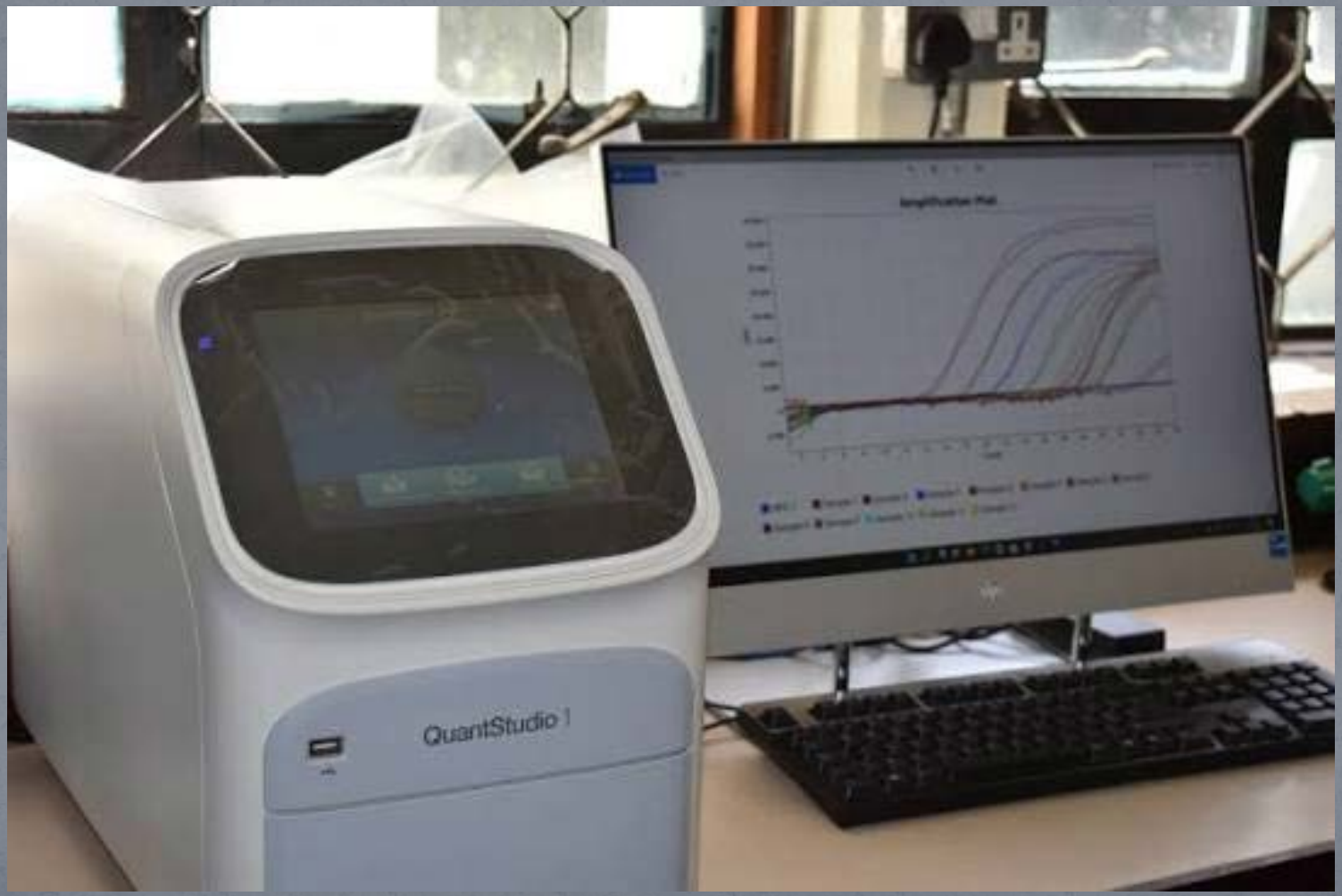
Kary Mullis

Intolerable Genius Berkeley's Most Controversial Nobel Laureate





Real Time PCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu



Real Time PCR

- Za razliku od klasičnog PCR-a, kod kojeg se produkt najčešće dokazuje po završetku reakcije elektroforezom, real-time PCR omogućava praćenje amplifikacije dok ona traje.
- Svaki ciklus obuhvata:

1. Denaturaciju – razdvajanje dva lanca DNK.

2. Vezivanje prajmera – prajmeri se vezuju za komplementarne sekvence koje ograničavaju ciljni region.

3. Elongaciju – termostabilna DNK polimeraza sintetiše nove lance DNK.

Real Time PCR

- Kako se dobija fluorescentni signal?
- Boje koje se vezuju za dvolančanu DNK, npr. SYBR Green Fluorescencija raste sa količinom dvolančane DNK.
- Specifične fluorescentne probe, npr. TaqManProba se vezuje za sekvencu unutar ciljnog fragmenta. Tokom elongacije polimeraza razgrađuje vezanu probu, razdvajajući fluorescentni reporter od prigušivača (quencher), pa signal raste.
- Cq, često označen i kao Ct, predstavlja broj ciklusa u kojem fluorescentni signal pređe postavljeni prag iznad pozadinskog signala.

Real Time PCR

1 Swab Collection

Nasopharangeal swab was collected from the suspected individual



2 Collected specimen

Specimen taken in viral transport medium was proceeded for RNA extraction



3 RNA extraction

Viral RNA was extracted from deactivated virus in BSL-3 facility

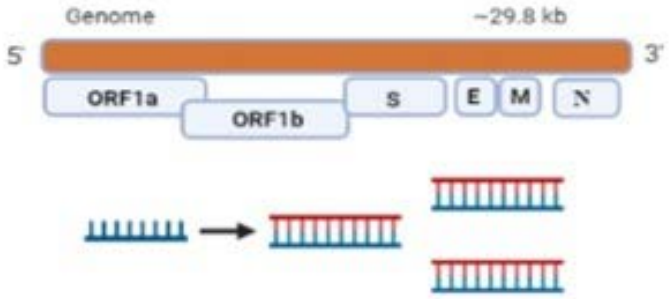


4 RT-qPCR

Amplification of purified RNA was done by qPCR



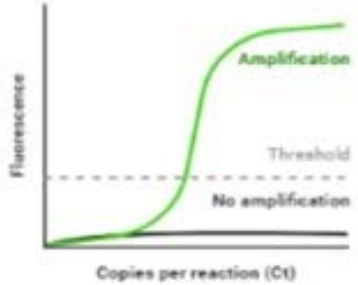
RT-qPCR machine



Reverse transcription

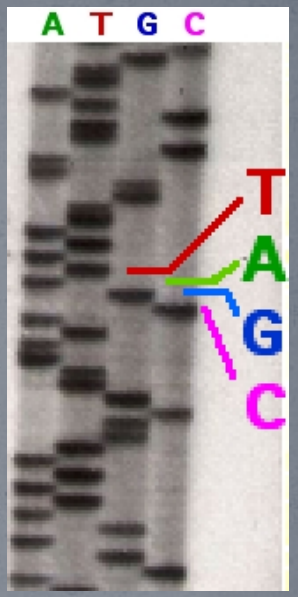
5 Results

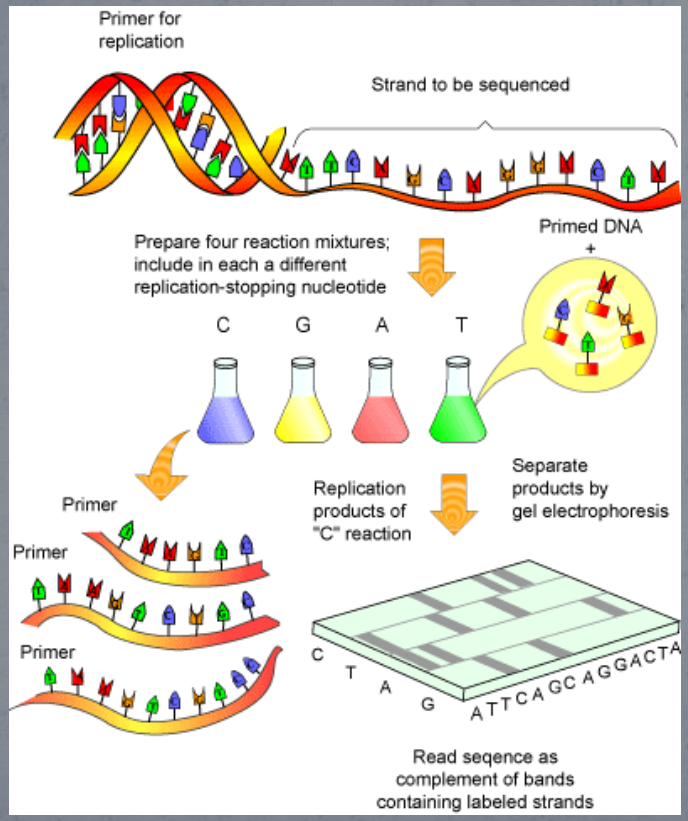
Sample of positive SARS- CoV2 patients crosses threshold

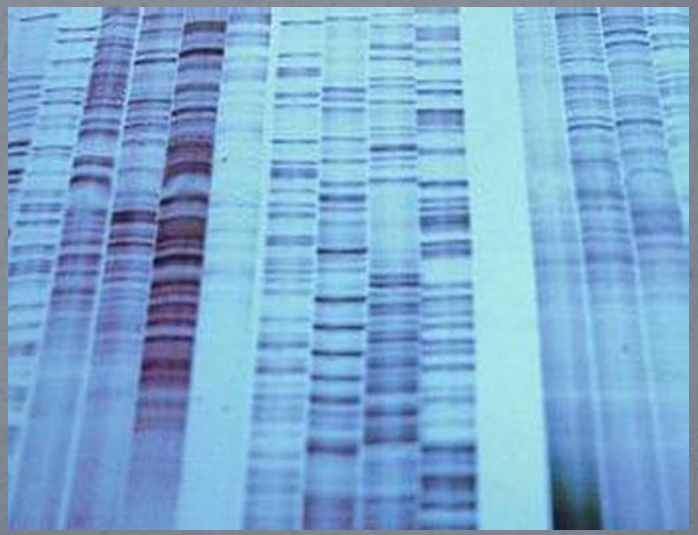


Sekvenciranje genoma

Sangerovo sekvenciranje - prekid sinteze DNK ugradnjom didezoksinukleotida (ddNTP), uz razdvajanje fragmenata kapilarnom elektroforezom.







Rasprostranjenost mikroorganizama

- Ljudi, životinje i biljke su novopridošli stanovnici u svetu mikroorganizama
- Mikroorganizmi se nalaze svuda
  - Zemljište
  - Voda
  - Vazduh
  - ”Makrokolonije ” prokariota- ljudi, životinje, biljke



Mikroorganizmi u zemljištu

- Broj mikroorganizama zavisi od brojnih faktora
  - Sastav zemljišta- hranljivost, neorganske i organske materije
  - Procenat vlage
  - pH optimalna 6-8
  - Temperatura



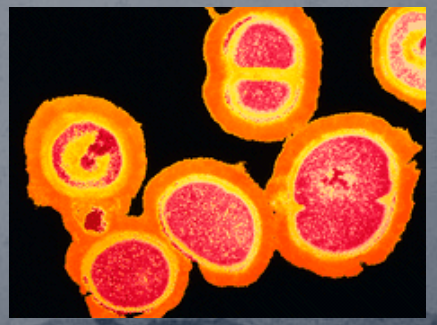
Broj mikroorganizama u zemljištu

- Kvalitet zemljišta
  - Glina 200-800 miliona u gramu
  - Crnica 5 milijardi u gramu
- Dubina
  - 2,5 cm — 4 milijarde u gramu
  - 15 cm — 2 milijarde u gramu
  - 50 cm — 500 miliona u gramu
  - 75 cm — milion u gramu
  - 1¸50 cm — 100 bakterija

Vrste mikroorganizama



- Bakterije – nitrifikujuće, azot fiksirajuće, denitrifikujuće, arheabakterije, sumporne bakterije...
- Plesni, protozoe, alge, lišajevi
- Biološko kruženje materija u prirodi- azot, vodonik, sumpor, fosfor, ugljenik, kiseonik
- Neophodne materije za sintezu organskih jedinjenja

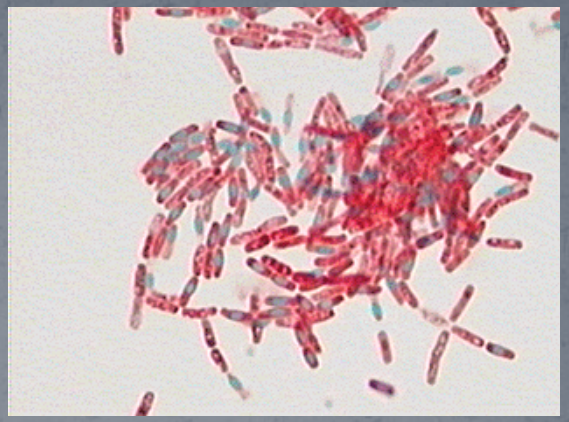


Patogene bakterije u zemljištu

- Nije pogodna sredina za njihovo preživljavanje

	Srednje vreme	Maksimalno vreme
Salmonella Typhi	2-3 nedelje	12 meseci
M. tuberculosis	13 nedelja	7 meseci
Brucella spp.	par dana -3 nedelje	2 meseca
Francisella tularensis	10 dana	2,5 meseci

Spore u zemljištu

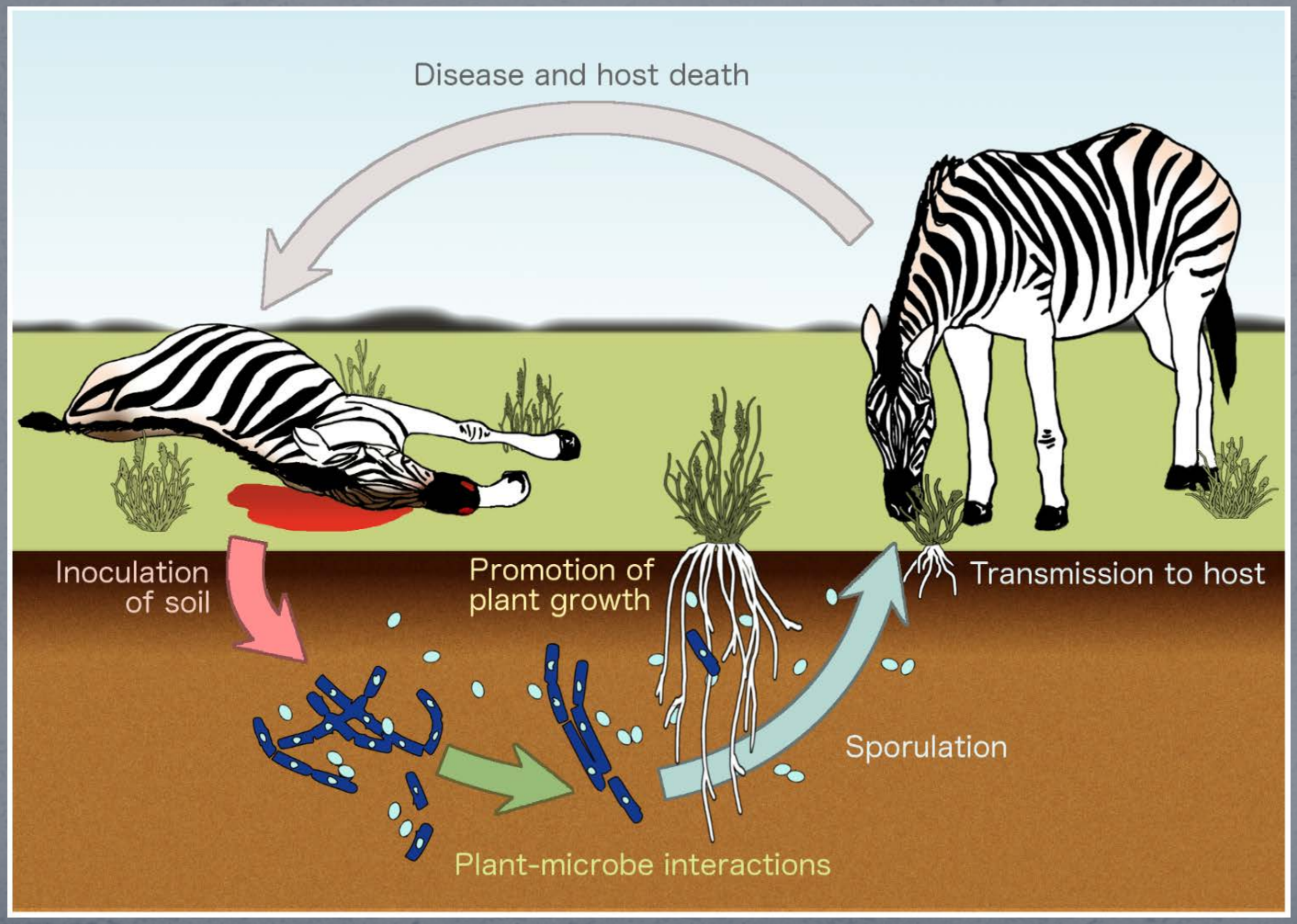


- Spore bakterija – dugo preživljavaju
  - Faktor prenošenja bolesti
  - Antraks, botulizam, gasni otoci, enterotoksemije
- Spore gljivica
  - Mikoze - aspergiloza
  - Mikotoksikoze- fuzariotoksikoze, ergotizam

Spore u zemljištu - *Bacillus anthracis*



Spore u zemljištu - *Bacillus anthracis*

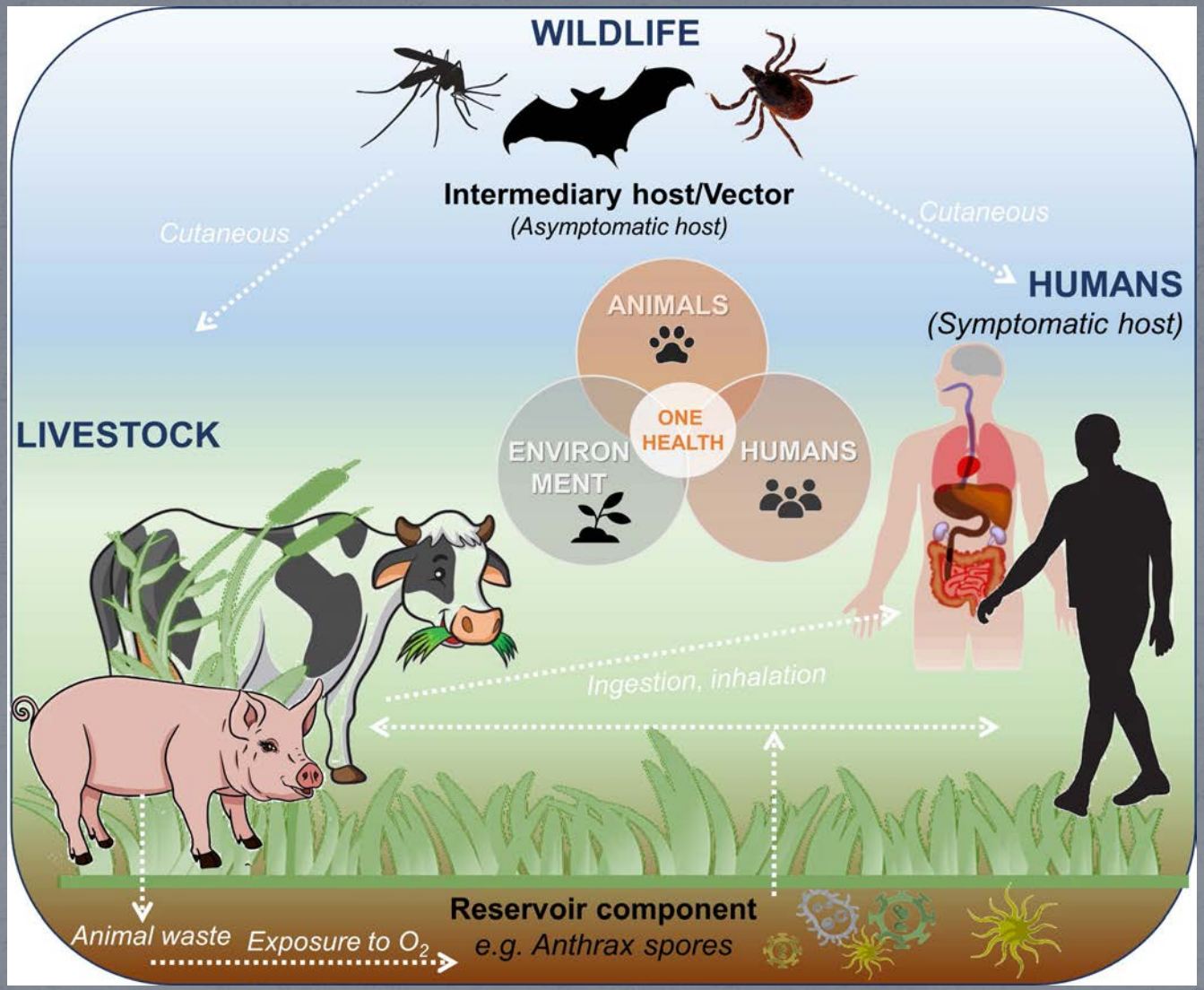


Mikroorganizmi u zemljištu

- Poplave mogu povećati rizik od antraksa i pojedinih klostridijalnih bolesti.
- Rizik je posebno značajan u poznatim antraksnim distriktima i u blizini starih mesta zakopavanja uginulih životinja.
- Šuštavac – *C. chauvoei* - poremećaj kontaminiranog zemljišta može povećati izloženost sporama, naročito kod mladih goveda.



Bacillus anthracis - antraks



Mikroorganizmi u vodi

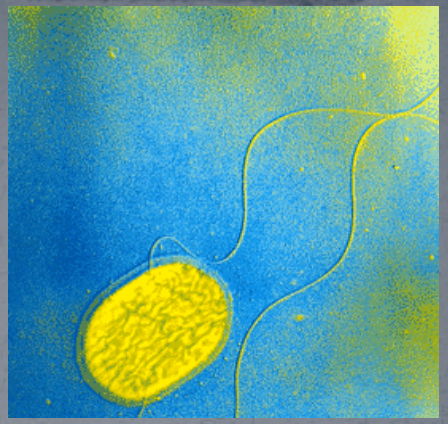
- Kontaminacija vode otpadnim vodama- prisustvo organskih materija
  - Nekontaminirane vode- mali broj- desetak m.o. u ml – saprofiti iz zemljišta, psihrofilni



Mikroorganizmi u vodi

- **Kontaminirane vode-** otpadne vode i kanalizacija – tri zone
  - **Polisaprobna** malo O_2, puno organskih materija broj u 1 ml dostiže milion i više, koliformni
  - **Mezosaprobna** mineralizacija organskih materija broj u 1 ml nekoliko stotina ili hiljada
  - **Oligosaprobna** – čista voda - broj u ml nekoliko desetina ili stotina

Patogene bakterije



- Od presudnog značaja
  - Stepen zagađenja vode
- Spore su najotporniji bakterijski oblici u vodi, dok među nesporogenim bakterijama dugotrajno opstaju naročito vrste prilagođene vodenim sredinama i životu u biofilmu.
- Preživljavanje u vodama izvora, reka i bunara
  - *Salmonella* spp. 2 dana – 3 meseca
  - *Leptospira* spp. 7-150 dana
  - *Vibrio cholerae* više meseci

Kvalitet vode

- Procena – broj i vrste mikroorganizama
  - Čista – do 100 m.o. u 1 ml
  - Sumnjiva- 100 – 150 m.o. u 1 ml
  - Zagađena – više od 500 m.o. u 1 ml



Kvalitet vode

- Higijenska ispravnost vode – broj *E.coli* i srodnih bakterija
  - Indikator fekalnog zagađenja
    - **Kolititar** – najmanja količina vode (izražena u ml) u kojoj se nalazi 1 koli bakterija
    - **Koliindeks** – broj bakterija E.coli u 1 l vode

Kvalitet vode

- *Enterococcus faecalis*
  - Indikator fekalnog zagađenja
- Voda put prenošenja infekcije
  - *Leptospira* spp, enterobakterije...
- Morska voda
  - Mikroorganizmi - slana voda prebivalište
  - Mikroorganizmi - tolerišu salinitet

Kolera

- **Voda je kod kolere prvenstveno sredstvo prenošenja uzročnika — bakterije *Vibrio cholerae*.**
- Čovek se inficira kada popije kontaminiranu vodu ili pojede hranu koja je njome oprana ili pripremljena. Prenošenje je **fekalno-oralno**: bakterije iz fecesa inficiranih osoba dospevaju u vodu, a zatim preko usta u organizam drugog čoveka.
- Prema procenama koje navodi Svetska zdravstvena organizacija (SZO), u svetu svake godine od kolere: oboli oko 1,3–4 miliona ljudi i umre oko 21.000–143.000 ljudi.

Mikroorganizmi u vazduhu

- Vazduh nije pogodno prebivalište ni za jedan mikroorganizam
- Do visine od 300-400 m mikroorganizmi se nalaze na česticama prašine



Faktori koji utiču na broj mikroorganizama u vazduhu

- Visina na kojoj su obavljena ispitivanja
- Mesto uzimanja uzorka - iznad zemlje više nego iznad vodenih površina, naseljena mesta
- Brzina i pravac vazdušnih strujanja
- Količina padavina- suvo vreme prisustvo većeg broja mikroorganizama u vazduhu
- Prostor – zatvorene prostorije štale...
- Klima uređaj ?

Patogeni mikroorganizmi u vazduhu

- Aerosol
- Dospevaju putem kapljica – infekcije organa za disanje – kapljična infekcija
- Čestice prašine ...
- Veličina čestice- “nosač ” 10.000 do 100.000 mikroorganizama
- Opasnost – veterinari, mikrobiolozi – kontakt sa mikroorganizmima npr ***Brucella*** spp, ***Mycobacterium tuberculosis***
- Arteficijalni put - ***Bacillus anthracis***

Patogeni mikroorganizmi u vazduhu - *Bacillus anthracis*

- Aum Šinrikjo (Aum Shinrikyo), japanska apokaliptična sekta i teroristička organizacija koju je predvodio Šoko Asahara.
- Njeni članovi su dolazili u Beograd, posetili su Muzej Nikole Tesle i proučavali njegove radove, tražeći ideje koje su zamišljali kao osnovu za razvoj oružja.
- Pokušaj biološkog napada 1993. godine: grupa je pokušala da izazove antraks u tokijskoj četvrti Kameido.

Pet pisama sa sporama antraksa 18 septembar 2001 SAD -5 osoba umrlo + 17 inficirano

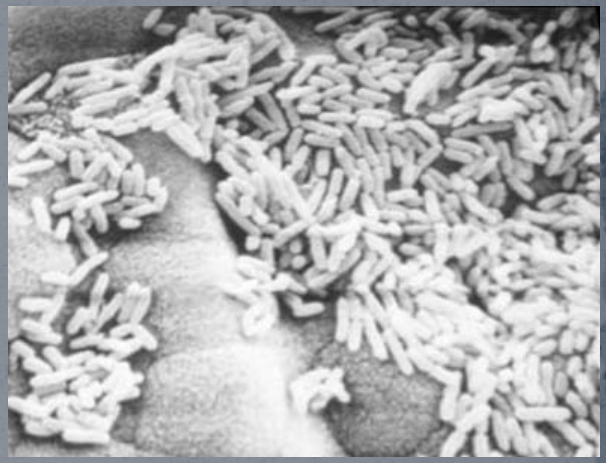


Bruce Edwards Ivins



Mikroflora životinjskog organizma

- Ukupno čovek blizu 40 hiljada milijardi mikroorganizama – 10^{14}
- Važna uloga u očuvanju zdravlja
  - Kompetitiva inhibicija- efekat barijere
  - Stalni imunski podražaj
  - Doprinos metaboličkim procesima
  - Homeostaza
    - Neonatalne alimentarne infekcije



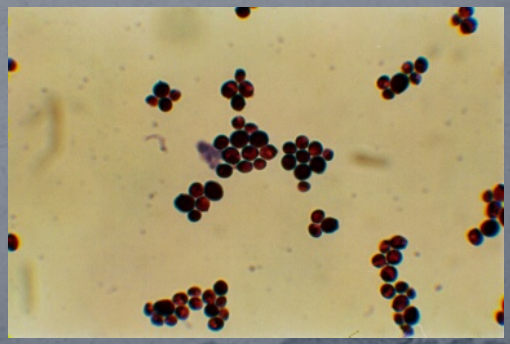
Holobiont

- **Holobiont** je složeni organizam koji se sastoji od domaćina zajedno sa svojim mikrobiomom (Margulis 1991).
- **Hologenom** je spoj svih gena domaćina sa svim genima u njegovom mikrobiomu.
- Broj bakterijskih ćelija u ljudskom telu se procenjuje na oko 38 hiljada milijardi, dok je procena za ljudske ćelije oko 30 hiljada milijardi.
- Broj bakterijskih gena se procenjuje na 2 miliona, 100 puta više od približno 20.000 ljudskih gena.

Mikroflora kože



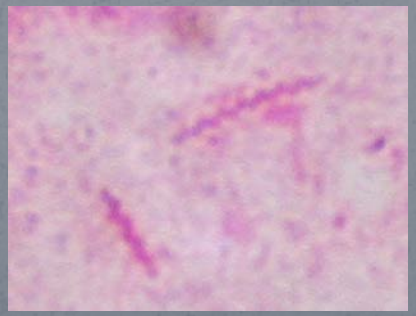
- Koža- najveći organ
- Intaktna koža- barijera koja sprečava prodor mikrooranizama
- Prisutan veliki broj saprofitskih ali i patogenih mikroorganizama
- Mogu biti prisutni stalno ili povremeno
  - ***Staphylococcus*** spp
  - ***Microsporum canis-*** mačke asimpomatske kliconoše



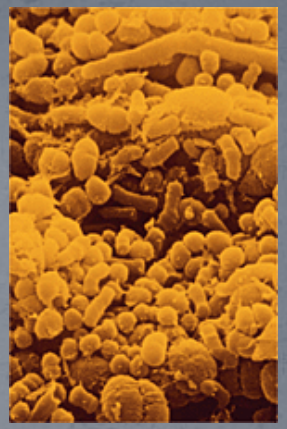
Mikroflora digestivnog trakta



- Broj mikroorganizama zavisi od dela digestivnog trakta
  - Debelo crevo 10 $^{11\text{-}15}$ mikroorganizama u ml
  - Želudac nekoliko stotina u ml
    - I u najnepovoljnijim uslovima postoje adaptirani mikroorganizmi – *Helicobacter pylori* - ureaza



Mikroflora predželudaca



- Jedinstveni ekološki sistem
- Primer simbioze između mikro i makro sveta
- Omogućeno razlaganje celuloze
- Brojne vrste bakterija, gljivica, protozoa, infuziorija...



Mikroflora tankih i debelih creva

- Tanka creva – sprečavanje vezivanja patogenih mikrooranizama – adherencija i kolonizacija – antagonističko delovanje
  - *Lactobacillus bulgaricus*
- Debela creva – živina i konj – slična uloga kao predželudaca kod preživara



Mikroflora tankih i debelih creva

- Dominantni anaerobni mikroorganizmi i do 99,9% od ukupnog broja
  - ***Bacteriodes, Eubacterium, Peptostreptococcus, Lactobacillus*** – do 10^{15}
  - ***Clostridium*** spp – do 10^{9}
  - ***E.coli*** 10^{6-7}
- Upotreba antibiotika- bolesti *Clostridium difficile*

Mikroflora tankih i debelih creva

- **Ileum**

- **Firmicutes/Bacillota** *Lactobacillus, Ligilactobacillus, Limosilactobacillus, Streptococcus, Enterococcus*

- **Proteobacteria/Pseudomonadota** *Pseudomonas*

- **Bacteroidota** *Bacteroides, Barnesiella*

- **Cekum**

- **Firmicutes/Bacillota**

- **Bacteroidota**

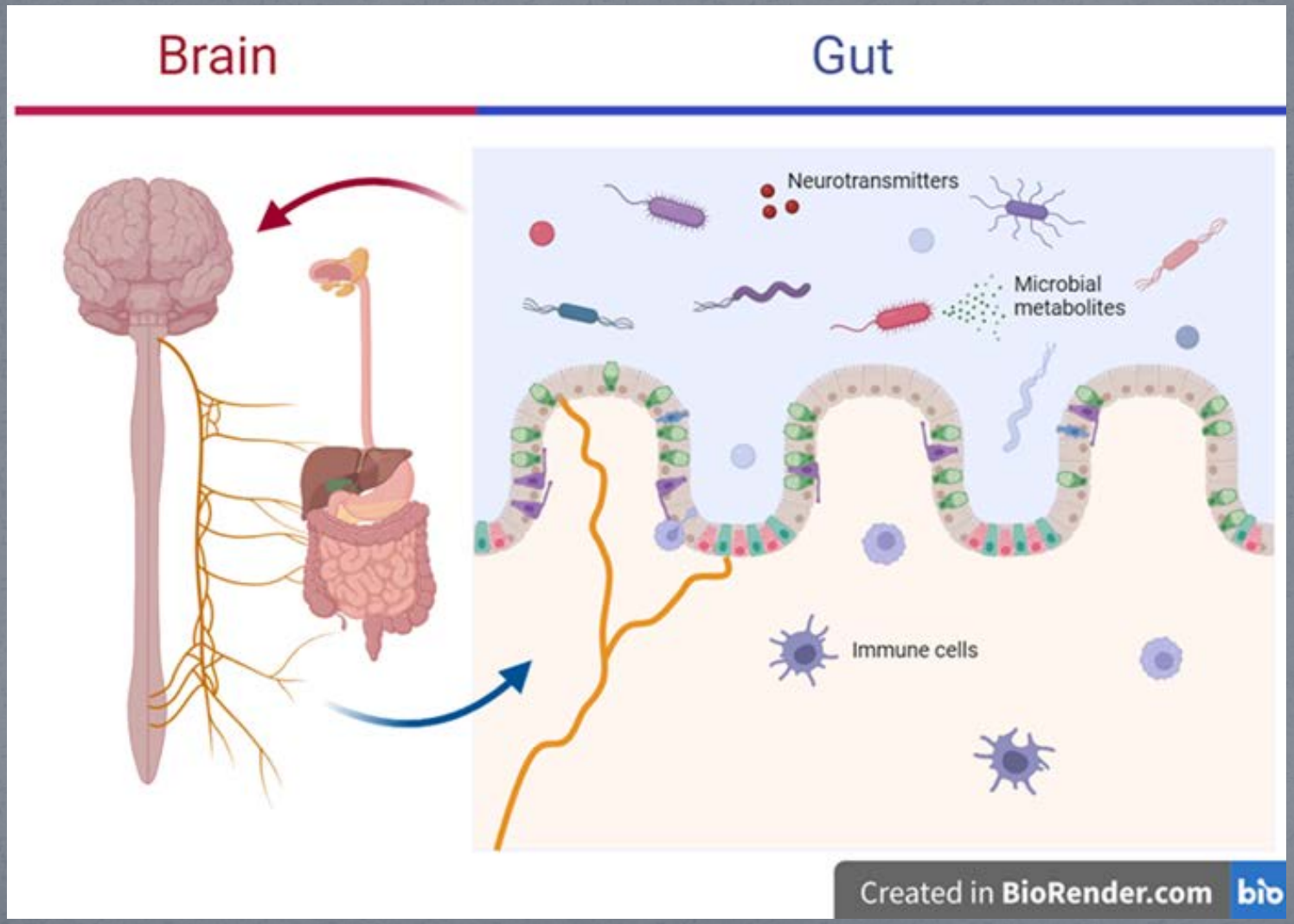
Fekalna transplantacija

- Fekalna transplantacija kod pasa, odnosno transplantacija fekalne mikrobiote (FMT), predstavlja unošenje crevne mikrobiote iz fecesa pažljivo odabranog, zdravog psa davaoca u digestivni trakt psa primaoca.
- Cilj je obnavljanje poremećene crevne mikrobne zajednice — disbioze.
- Za razliku od probiotika, koji obično sadrže nekoliko odabranih sojeva, FMT prenosi složenu mikrobnu zajednicu, zajedno sa njenim metabolitima i drugim sastojcima fekalnog materijala.

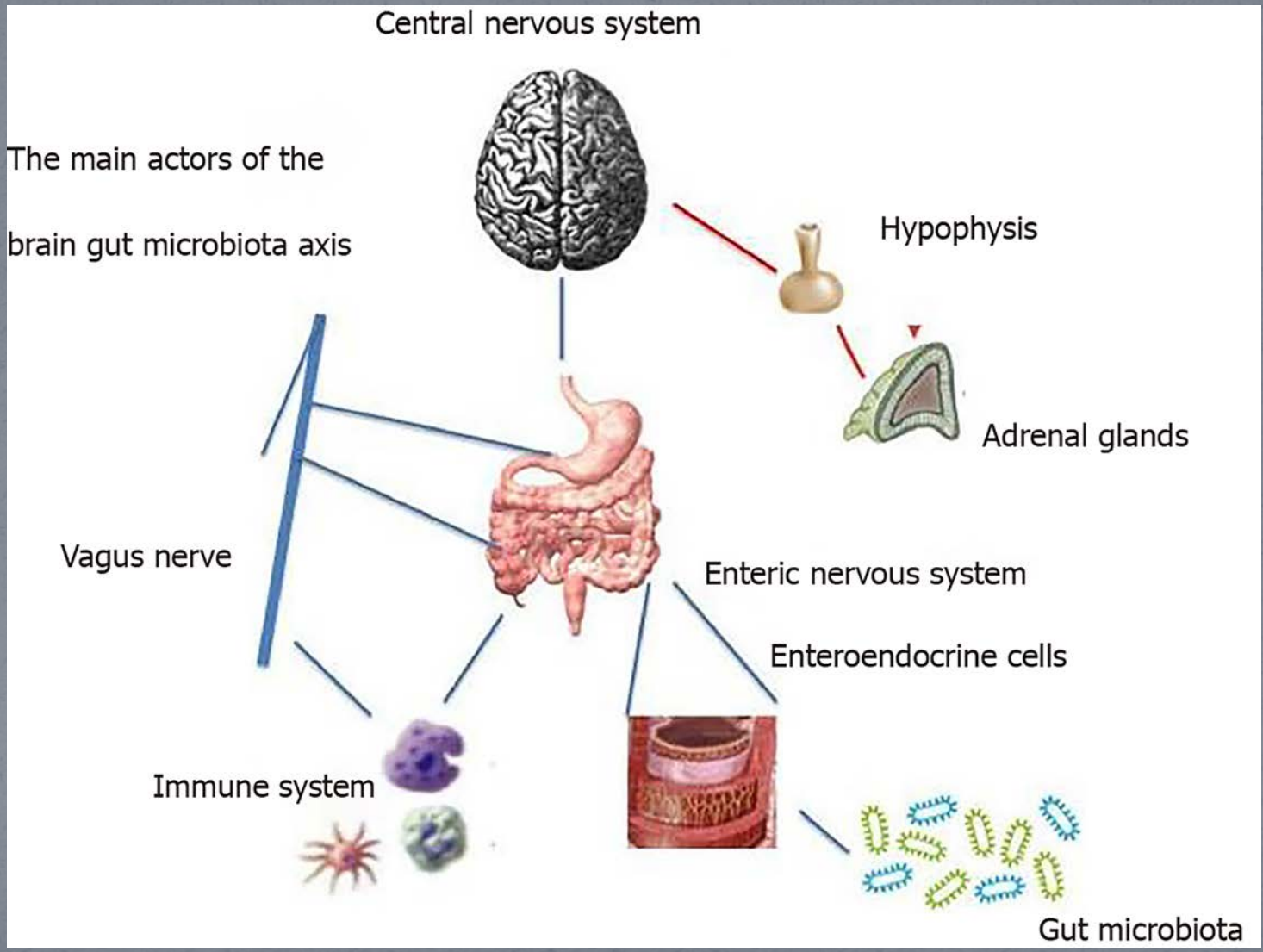
Crevno-moždana osa

- Gut-brain axis predmet je intenzivnog istraživanja u polju neurologije, psihijatrije, gastroenterologije i mikrobiologije
- *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* i *Bacillus*, kao i kvasnica *Saccharomyces*
- Pilot studija - *Bifidobacterium longum NCC3001* – depresija kod ljudi
- Bakterije mogu proizvoditi mnoštvo neuroaktivnih supstanci, kao što su dopamin, serotonin, gama-aminobuterna kiselina (GABA), norepinefrin itd.

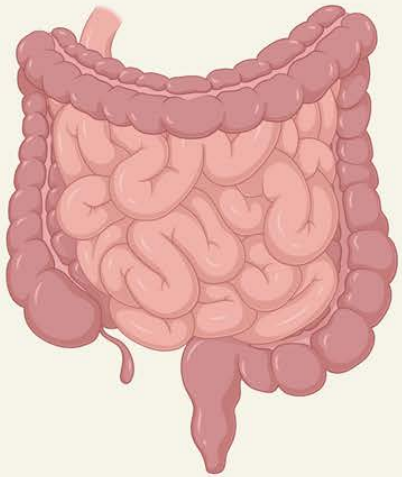
Crevno-moždana osa



Crevno-moždana osa



Microbiota gut-brain axis



Gut microbiome

- Metabolites
- Neurotransmitters
- Hormones

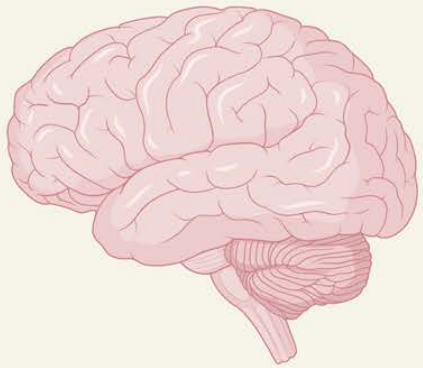
Immune system

Vagus nerve

Enteric nervous system

Neuroendocrine system

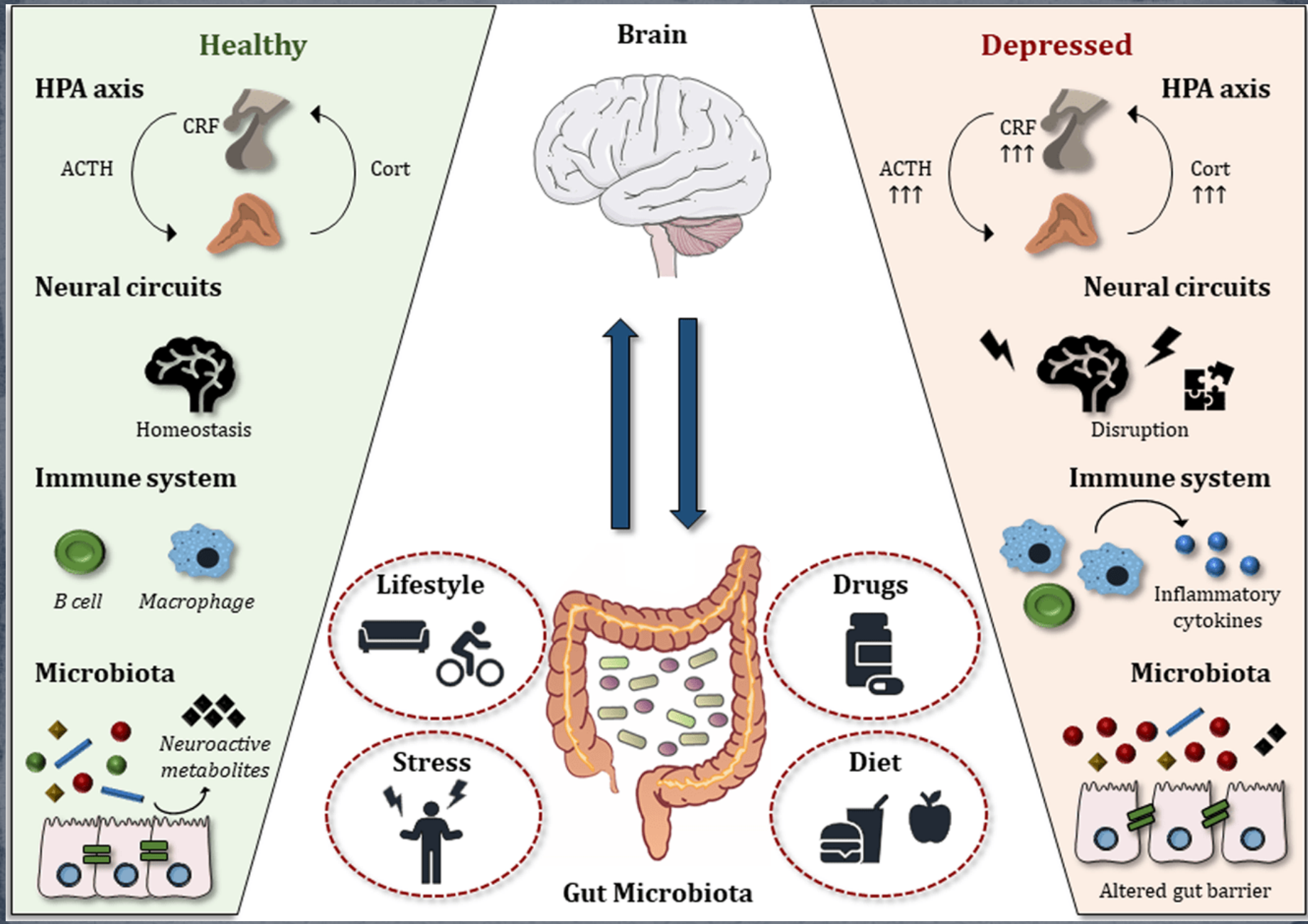
Circulatory system



Altered social behaviour
- Autism spectrum disorder (ASD)
- Anxiety
- Depressive-like behavior

Physical performance and motivation

Neurodegenerative diseases


Healthy
HPA axis
CRF
ACTH
Cort
Neural circuits
Homeostasis
Immune system
B cell
Macrophage
Microbiota
Neuroactive metabolites
Brain
Lifestyle
Drugs
Stress
Diet
Gut Microbiota
Depressed
HPA axis
CRF ↑↑↑
ACTH ↑↑↑
Cort ↑↑↑
Neural circuits
Disruption
Immune system
Inflammatory cytokines
Microbiota
Altered gut barrier

Mikroflora drugih sluznica

- Respiratorni trakt
  - 200-500 puta veća količina vazduha prilikom udisaja nego ona kod izdisaja
  - 4% bakterija stiže do bronhija
- Urogenitalni trakt
  - Vaginalna flora antagonistički na patogene mikrooganizme
  - I promene u kvantitativnom odnosu mikroflore mogu rezultirati infekcijom - disbioze

Mikroorganizmi u namirnicama animalnog porekla

- Saprofitski mikrooranizmi koji doprinose stvaranju određenih organoleptičkih karakteristika proizvoda
  - Zrenje mesa
  - Fermentacija mesa, mleka
- Patogeni mikroorganizmi
  - Infekcije – ***E.coli, Salmonella*** **spp, C*ampylobacter* spp**
  - Intoksikacije – **enterotoksin *Staphylococcus vrsta, Bacillus cereus***
  - Toksoinfekcije – ***Clostridium botulinum***

Gnotobiologija

- Naučna disciplina koja se bavi izučavanjem biologije organizama bez mikroorganizama
- Cilj ispitivanja - patologija infektivnih bolesti, imunologija i fiziologija
  - **Monobiotičke životinje** – apsolutno sterilne
  - **Dibiotičke životinje** – sadrže 1 vrstu m.o.
  - **Polibiotičke životinje** – sadrže više od 1 vrste m.o.