

A taxonómiai, epidemiológiai, nozológiai, pathogenetikai rendszerezés alapjai és a humán mikrobiológiában fontos alapfogalmak (pathogenitás, virulencia, pathomechanizmus, molekuláris pathogenezis, virulencia faktorok, fertőzés és megbetegedés)

# Együttélés formái



**Kommenzalizmus** pl. testüregék normál mikroba flórája



**Mutualizmus** pl. Rhizobium fajok és pillangósvirágúak



**Parazitizmus**  
egyértelműen kórokozók

# Fertőzés és fertőző betegség

- Mikroorganizmus tulajdonságai
  - Csíra mennyisége
  - Virulencia tulajdonságai
- A fertőzés forrása és rezervoárja
- A fertőzés átviteli módja
  - Levegő
  - Kontakt terjedés
  - Terjedés közös közvetítő eszközökkel
  - Terjedés vektorokkal
- A fertőzés kapui
- A kórokozó ürítésének módjai
- A gazdaszervezet fogékonysága

# A kórokozó-gazdaszervezet kapcsolata

- Infekció: a potenciálisan patogén mikroba a megfelelő behatolási kapun keresztül bejut a gazdaszervezetbe
- Betegség: egyik következménye lehet az infekciónak
- Az infekció következménye lehet tünetmentes

# A kórokozó

- Kolonizáció: a patogén jelen van a gazdaszervezetben, de nem vált ki specifikus immunválaszt, vagy betegséget
- Endogén infekció: a gazdaszervezet saját flórája válik kórokozóvá
- Exogén infekció: a gazdaszervezeten kívülről bekerülő kórokozó

# Az infekciót befolyásoló tényezők a gazda szervezet oldaláról

- Az expozíciót befolyásoló tényezők:
  - Állatkontaktus
  - Életkorral összefüggő viselkedési formák
  - Gyógyszer használat
  - Alkohol fogyasztás
  - Vér és vérkészítmény alkalmazása
  - Összezártság (laktanya, kollégium)
  - Étél, víz fogyasztás
  - Kórházi tartózkodás
  - Higiénés viszonyok
  - Utazás stb.....

# Az infekciót befolyásoló tényezők a gazda szervezet oldaláról

- Faktorok, amelyek befolyásolják az infekciót és a kialakult betegség súlyosságát
  - Életkor
  - Alkoholizmus
  - Fejlődési rendellenességek
  - Antibiotikum rezisztencia (mikroorganizmus oldaláról)
  - Antibiotikum alkalmazás (gazdaszervezet oldaláról)
  - Krónikus betegségek
  - Immun állapot
  - Tápláltsági állapot
  - A fertőző ágens belépési kapuja stb...

# A betegség terjedésének módja

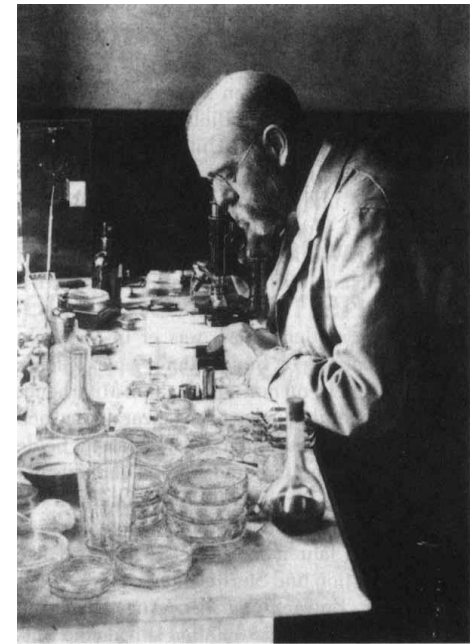
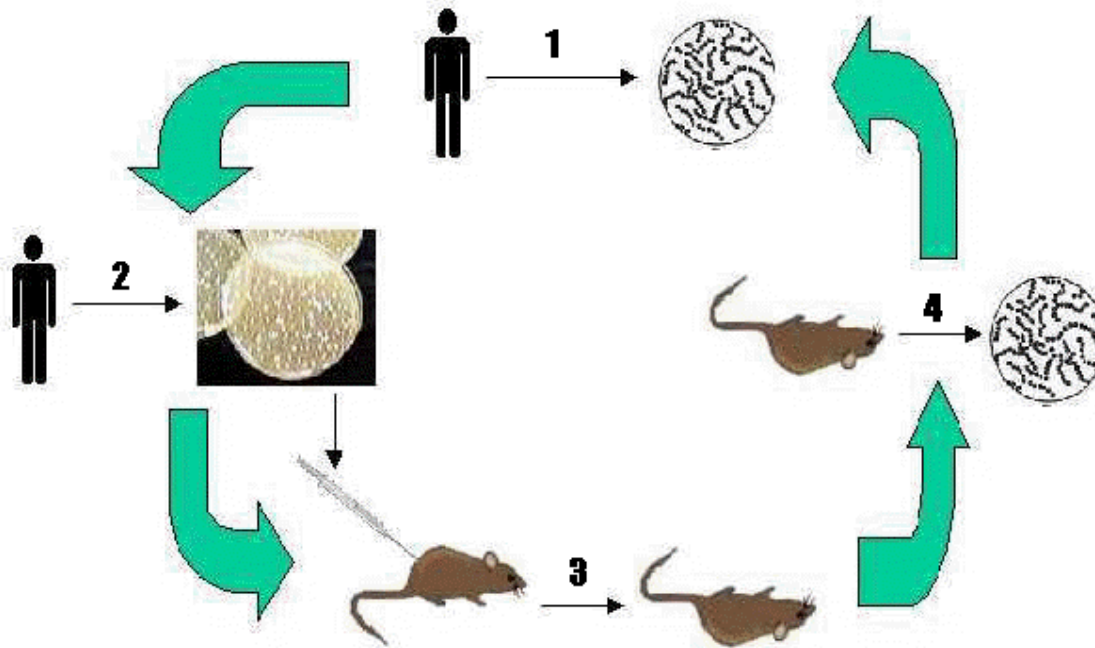
- Direkt:
  - Kontakt úton: harapás, földdel való szennyezés
  - Szexuális úton
  - Cseppfertőzéssel
  - Transplacentaris úton
- Indirekt:
  - Anyag közvetítette - víz, élelmiszer, vér, műszer, szerv
  - Vektor közvetítette infekció
  - Levegő közvetítette infekció: 1-5  $\mu\text{m}$  nagyságú partikulumok



# Alapfogalmak

- Patogenitás:
  - valamely mikroorganizmus betegségokozó képessége.
  - Függ a mikroorganizmus és a gazdaszervezet viszonyától, a gazdaszervezet védekezőképességétől és válaszreakciójától.
- Patogenitás spektruma:
  - mely fajokat betegít meg
- Patogén:
  - ép védekező rendszerű, fogékony személyek többségében betegséget okoz
- Opportunista kórokozó:
  - csak meghatározott körülmények között képes betegséget okozni (csökkent védekező képesség, bejutást segítő tényezők)

# Koch posztulátumok



1. A mikroorganizmus az adott betegség minden esetéből kimutatható legyen, a szervezetben való eloszlása feleljen meg a kóros elváltozások lokalizációjának.
2. A mikroorganizmust színtenyészetben mutassuk ki a betegből.
3. A kitenyésztett mikroorganizmust érzékeny kísérleti állatba oltva a típusos betegséget lehessen kiváltani.
4. A mikroorganizmus színtenyészetben legyen visszatenyészthető a kísérleti állatból.

# Molekuláris Koch-posztulátumok

1. A vizsgált fenotípusos tulajdonság legyen jellemző a faj virulens törzseire.
2. A vizsgált tulajdonságért felelős gén(ek) fajlagos inaktiválása mérhetően csökkentse a törzs virulenciáját.
3. A mutációt szenvedett gén allélikus pótlása állítsa helyre a vad törzsre jellemző szintű, eredeti virulenciát.

# A virulenciafaktorok

- Exotoxinok
- Endotoxin
- A patogenezist elősegítő extracelluláris enzimek
- A baktériumfelület virulenciát fokozó komponensei: antifagociter hatású molekulák, kolonizációs és inváziós faktorok

# Exotoxinok

- Gr + és Gr – baktériumok termelik
- Környezetbe (táptalaj, gazdaszervezet) kiválasztódik
- Fehérje természetű
- Általában hőlabilis
- Proteináz érzékeny
- Jó antigének
- Ellenük antitoxikus ellenanyagok termelődnek
- Toxoiddá alakíthatók (kivétel: erythrogén toxin)
- Hatásuk inkubációs idő után következik be
- Tisztított állapotban igen toxikusak, közülük kerülnek ki a leghatásosabb ismert toxinok (pl. botulinus toxin)

# Exotoxinok

- Citolitikus toxinok

- Membránroncsoló

- Enzim

- Pl. *C. perfringens* lecitináz

- Pórusformáló

- Pl. *S. aureus*  $\alpha$ -toxin, *S. pyogenes* sztreptolizin-O, *E. coli* hemolizin

- Fehérjeszintézist blokkoló

- A és B alegység pl. *P. aeruginosa* A toxin, *C. diphtheriae* toxin

- Ciklikus AMP-szintet emelő toxinok

- Pl. *E. coli*, cholera toxin

- Neurotoxinok

- Pl. tetanus toxin, botulinus toxin

# Endotoxin

- Gr- baktériumok LPS-nek lipid-A komponense
- A külső membránban elhelyezkedő struktúrmolekula
- Biológiai hatás ua.
- A baktérium szétesésekor szabadul fel
- Rövidebb inkubációs idő után hat
- Hőstabil
- Rezisztens a proteolitikus enzimekkel szemben
- Kevésbé immunogén
- Nem alakítható toxoiddá

# Endotoxin

- Pirogén hatás
  - IL-1 és TNF $\alpha$  molekulák felszabadulásának előidézése
  - Leukocyták száma először csökken, majd nő
  - Makrofágok aktiválódnak
  - Lizoszomális enzimek termelése nő
  - Phagocytá-készség fokozódik
  - B-lymphocyták osztódása nő
  - Erőteljes immunadjuváns hatás
  - Thrombocytaszám csökken
  - Vasodilatatio, vérnyomásesés
  - Komplementrendszer aktiválása
  - Akut fázis proteinek szintje nő
- Endotoxin shock alakulhat ki (RR csökkenés, csökkent perfúzió miatt szervfunkciós zavarok, metabolikus acidosis, thrombocytolysis, DIC)



# A patogenezist segítő extracelluláris enzimek

A kórokozó túlélését és invázióját elősegítő enzimek

- Koaguláz
- Plazminogén aktivátorok (fibrinolizinek)
- DN-áz, RN-áz, (NADáz)
- Hialuronidáz
- Proteázok
- Kollagenáz
- Elasztáz
- IgA1-proteázok
- Ureázok
- Antibiotikumokat hatástalanító enzimek

A baktériumfelület virulenciát fokozó komponensei: antifagociter hatású molekulák, kolonizációs és inváziós faktorok

- Antifagociter molekulák
  - Poliszacharidok
    - Negatív töltés akadályozza a phagocytosist
    - Bizonyos tokantigének szövetaffinitást biztosítanak
      - *E. coli* K1, K92, K100...
- Biofilm, slime-képzés
  - Tapadás, védekezés atb, szervezet immunrendszer ellen
- Csillók
- Kolonizációs faktorok
  - Pl. P fimbria – *E. coli* – ÚTI
- invázió

# **A klinikai bakteriológiai diagnosztika alapjai**

## A fertőző betegségek mikrobiológiai diagnosztikája

- differenciáldiagnosztika  $\Rightarrow$  fertőző ágens
- A klinikum és a mikrobiológiai laboratórium partnerként együtt dolgoznak a fertőzések etiológiájának felderítésében
- megfelelő mintavétel a lehető legoptimálisabb mikrobiológiai módszerrel végezhető diagnosztikai vizsgálathoz



## Mintavételi szabályok

- **antibiotikum terápia megkezdése előtt történjen**
- **kontamináció elkerülése (normál flórával történő is!)**
- **megfelelő mennyiség (pl. liquor-2ml)**
- **mintavevő eszköz kiválasztása a mintától függ**
  - **tamponos mintavétel (+ 1 a kenetkészítéshez)**
  - **aspirátumhoz, folyadékhoz steril cső**
  - **hemokultúrás palack(ok)**
  - **speciális transzporttáptalajok (Uricult, Gonoline, stb.)**
- **transzportközeg**
- **a minta azonosíthatósága**

**Szállítás során a megfelelő közeg, idő, hőmérséklet biztosítása !**

## Mintavételi szabályok III.

- **Kísérőlap / vizsgálatkérőlap megfelelő kitöltése**
  - **Betegre vonatkozó adatok:**
    - **kor, nem**
    - **alap-, kísérőbetegségek, feltételezett diagnózis**
    - **kapott kezelés (atb, immunszuppresszió, stb)**
  - **Mintára vonatkozó adatok:**
    - **mikor**
    - **honnan**
    - **miért – speciális kérések!**
  - **Vizsgálatot elrendelő orvos adatai**
    - **munkahely, aláírás, pecsét**

# A mikrobiológiai diagnosztika alapvető módszerei

## ***I. A kórokozónak vagy anyagainak direkt kimutatása és identifikálása a vizsgálati anyagból***

**a) a vizsgálati anyag makroszkópos megtekintése**

**b) natív és/vagy festett készítmény mikroszkópos vizsgálata**

**c) állatoltás**

**d) szerológiai vizsgálatok ( IF , immun EM, ...)**

**e) „új” diagnosztikus megközelítések**

**- géntermékek kimutatása**

**- antigén detektálás**

**- toxin(ok) detektálása**

**- gének kimutatása / PCR, génpróbák/**

**- nem kell feltétlenül kórokozó specifikus**

**- multiplex rendszerek**

## **II. A) *A kórokozó kitenyésztése a vizsgálati anyagból***

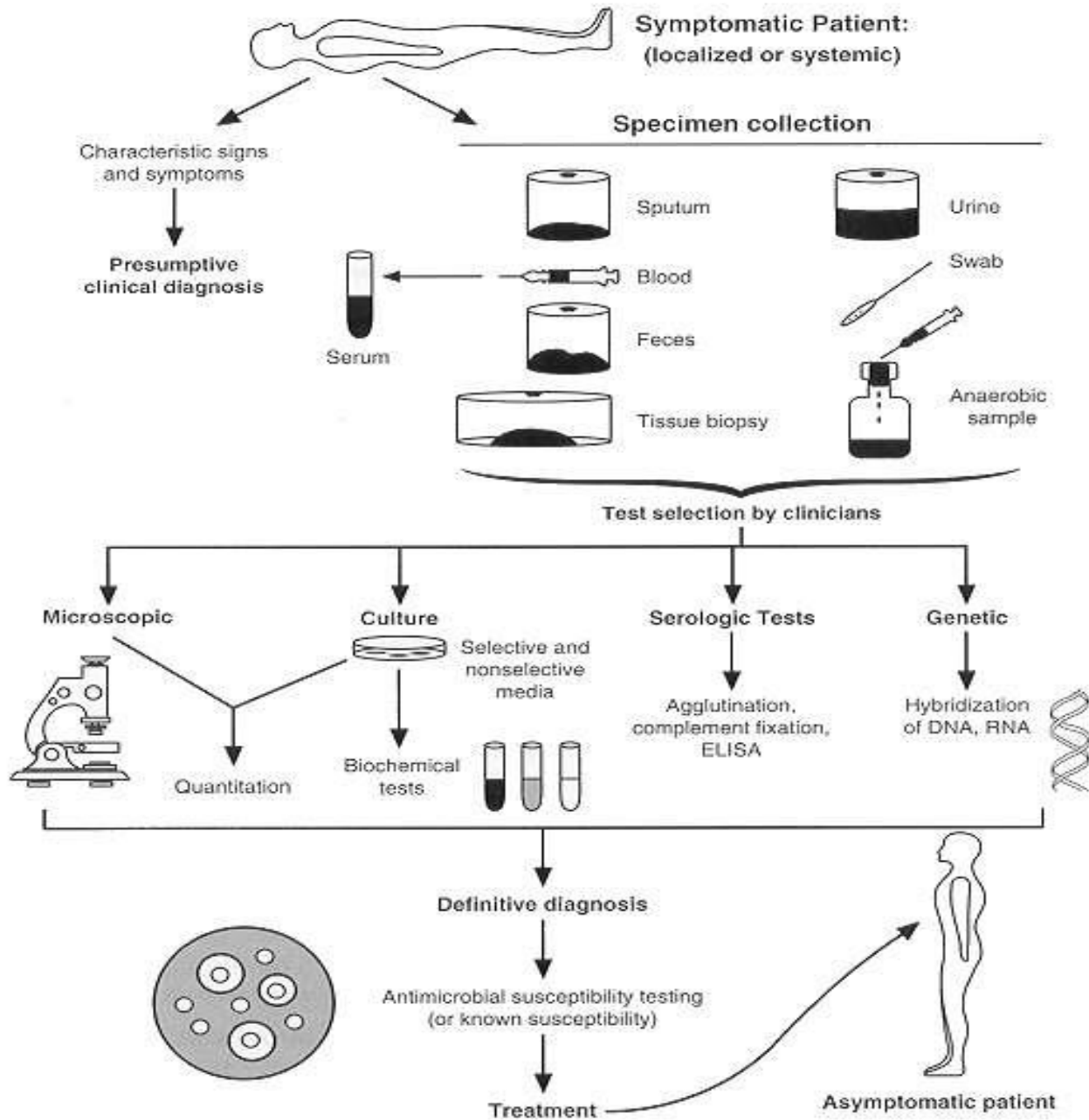
### **B) *A kitenyésztett kórokozó identifikálása***

- a) makroszkópos telepmorfológia alapján**
- b) mikroszkópos morfológia, CP hatás alapján**
- c) biokémiai reakciók segítségével**
- d) szerológiai reakciók segítségével / speciális antiszérumok**
- e) állatoltás**
- f) fágtypizálás**
- g) molekuláris biológiai módszerekkel /gén-termék-funkció/**
- h) patogén- nem patogén törzsek elkülönítése ugyanazon fajon belül**

### **C) *Antibiotikum érzékenység vizsgálata***

## **III. *A fertőzések hatására keletkezett humorális és celluláris immunkészültség, specifikus ellenanyagok kimutatása***





## Ad I/b Mikroszkópos vizsgálatok

- **natív/festett készítmény**
- **érzékenysége: >1000 kórokozó/ ml vagy gr**
- **leggyakrabban alkalmazott festési eljárások**

**Metilénkék** ⇒ mo.morfológiája, jelenléte

**Gram-festés** ⇒ mo. morfológia, Gram+/-

Acridin-orange ⇒ fluoreszcens mikroszkóppal; érzékenyebb

Saválló festések

⇒ **Ziehl-Neelsen** és Kinyoun - karbolfukszinalapúak

⇒ fluorochrom festés – auromint és rhodaminod alkalmaz, melyek a sejtfal mycolsavhoz kötődnek; érzékenyebb

Calcofluor white ⇒ cellulózhoz és kitinhez kötődik; gombák festése

Fluoreszcens Ab-t tartalmazó festés ⇒ monoklonális vagy poliklonális ellenanyagot tartalmaz specifikusan a vizsgálandó mo. szemben(DIF, IDIF)

**Neisser-festés** ⇒ corynebacterium volutinszemcséi

# Mikroszkópos vizsgálatok

## 1. Fénymikroszkóp

- lencse:üveg, kvarc;
- energia:látható fény, UV fény;
- kép:retinán

felbontó képesség: 250nm

( az a legkisebb távolság, amellyel elválasztott szerkezeti részletek még különállónak látszanak )

- maximális nagyítás: 1000-1500 X olaj immerzióval  
⇒ baktériumok, gombák, protozoonok vizsgálatára

## 2. Elektron mikroszkóp

- transmissziós elektron mikroszkóp
- scanning elektron mikroszkóp
- lencse: elektromágneses erő
- energia: gyorsított elektronok 50-1000KV
- kép fluoreszcens mezőn

felbontó képesség: 0,1 nm

maximális nagyítás: 500 000X

⇒ vírusok

### 3. Sötétlátóteres mikroszkóp

\* speciális kondenzor → „sötét háttér” az élő, mozgó baktériumok alakja fel-felcsillan  
⇒ Spirochéták vizsgálatára (treponema, borrelia, leptospira), keskenyebbek, mint a normál fénymikroszkóp felbontóképessége



A sötétlátóteres mikroszkópban jól megfigyelhető az egyes mikroorganizmusok, pl. Spirochaeták mozgása

Használt eszközök

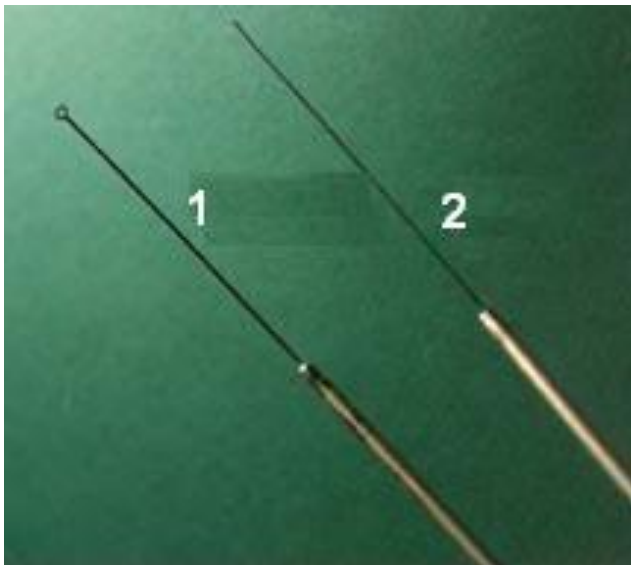
Tárgylemez:

Mindig tiszta, zsírtalanított.

- Bunsen égő lángja felett 2-3-szor áthúzzuk a Cornet-csipeszbe fogott tárgylemezt.

Oltókacs (oltótű)- Sterilizálása lángban égetve izzásig, majd használat előtt időt hagyva a lehülésre

Minden használat után (és előtt) sterilizáljuk a kacs



Oltókacs (1), oltótű (2)



A kacs helyes  
leégetése

## Natív készítmények

- Élő mikróbák vizsgálata  
( baktériumok, gombák, protozoonok, féregpeték)
- betegből vett mintában jelen vannak-e
- nagyság
- alak
- mozgás
- belső szerkezet
- metabolizmus
- szaporodás

## A . Lapos csepp

- folyékony szuszpenzióból tárgylemez közepére egy cseppnyit helyezünk kaccsal vagy pipettával  
vagy
- tárgylemezre cseppentett steril fiziológiás sóoldatban szuszpendáljuk a szilárd tenyészetből kaccsal felvett kis mennyiségű mikroorganizmust és jól elszuszpendáljuk
- fedőlemezzel lefedjük
- süllyesztett kondenzorral, szűk diafragmával, kis nagyításon (400X max.) vizsgáljuk



## Festett készítmények

A festődés a baktériumsejt (gomba, protozoon) alkotórészei és a festékoldat között lezajló fizikai – kémiai reakciók eredménye. A bázikus festékek a baktérium sejtek savanyú vegyhatású alkotóit (pl. magkromatin), a savanyú festékek a baktérium sejtek bázikus elemeit (pl. citoplazma) festik

## Kenetkészítés és fixálás

Folyékony mintából:

A tiszta, zsírtalanított tárgylemezen a kaccsal felvett szuszpenziót kb. köröm nagyságú területen elszélesztjük, majd szobahőn hagyjuk megszáradni.

Kitenyésztett mintából:

A laposcseppnél leírt módon szuszpenziót készítünk, majd elkészítjük a kenetet.

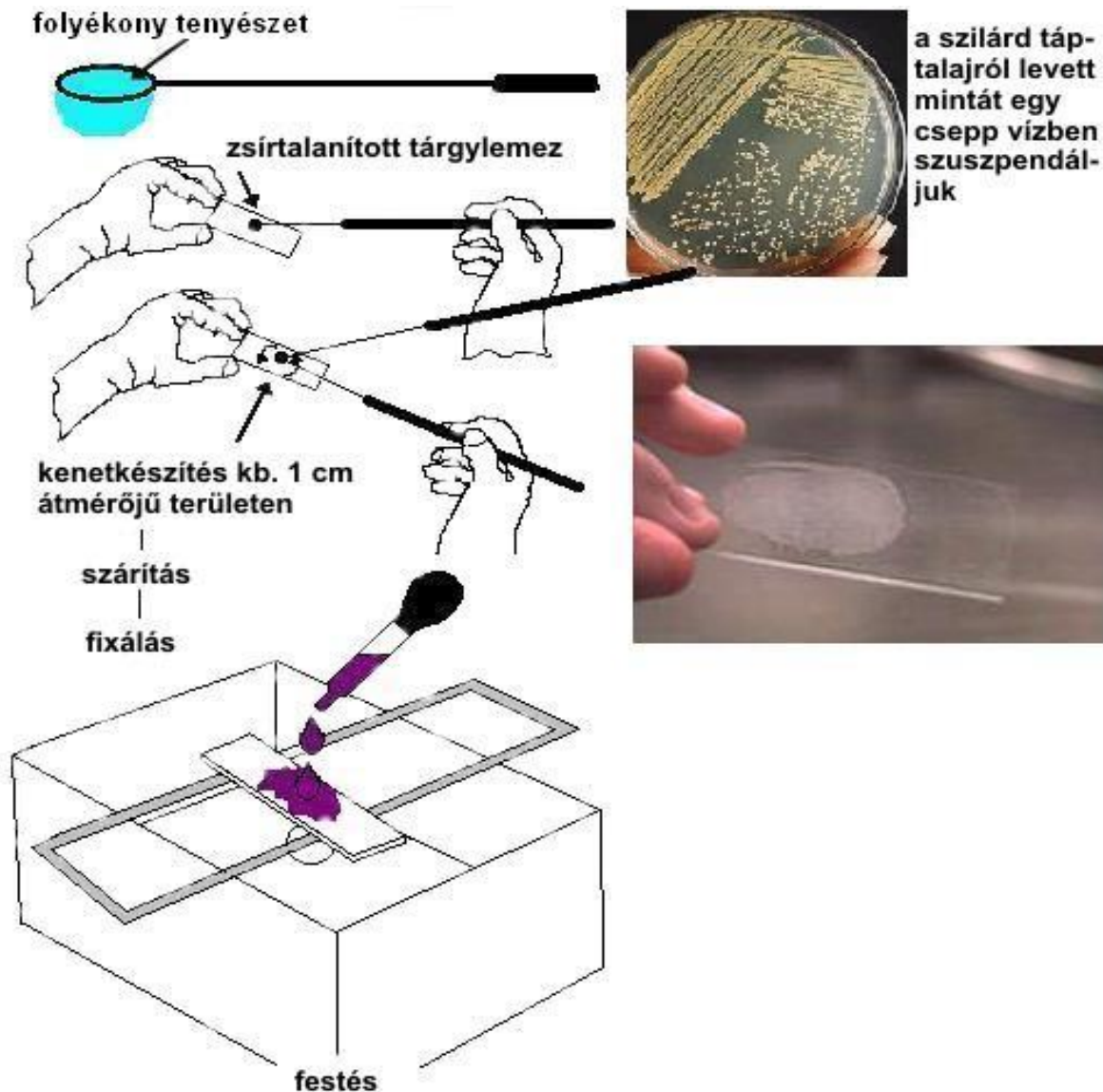
Szobahőn száradás után a fixálás hővel történik. A Bunsen égő lángja felett (kikent oldalával felfelé) a Cornet csipeszbe fogott tárgylemezt 3x áthúzzuk.

- 65-75 °C felett a mikróbák elpusztulnak
- a fehérjék koagulálódnak
- szilárdan a tárgylemezre tapadnak

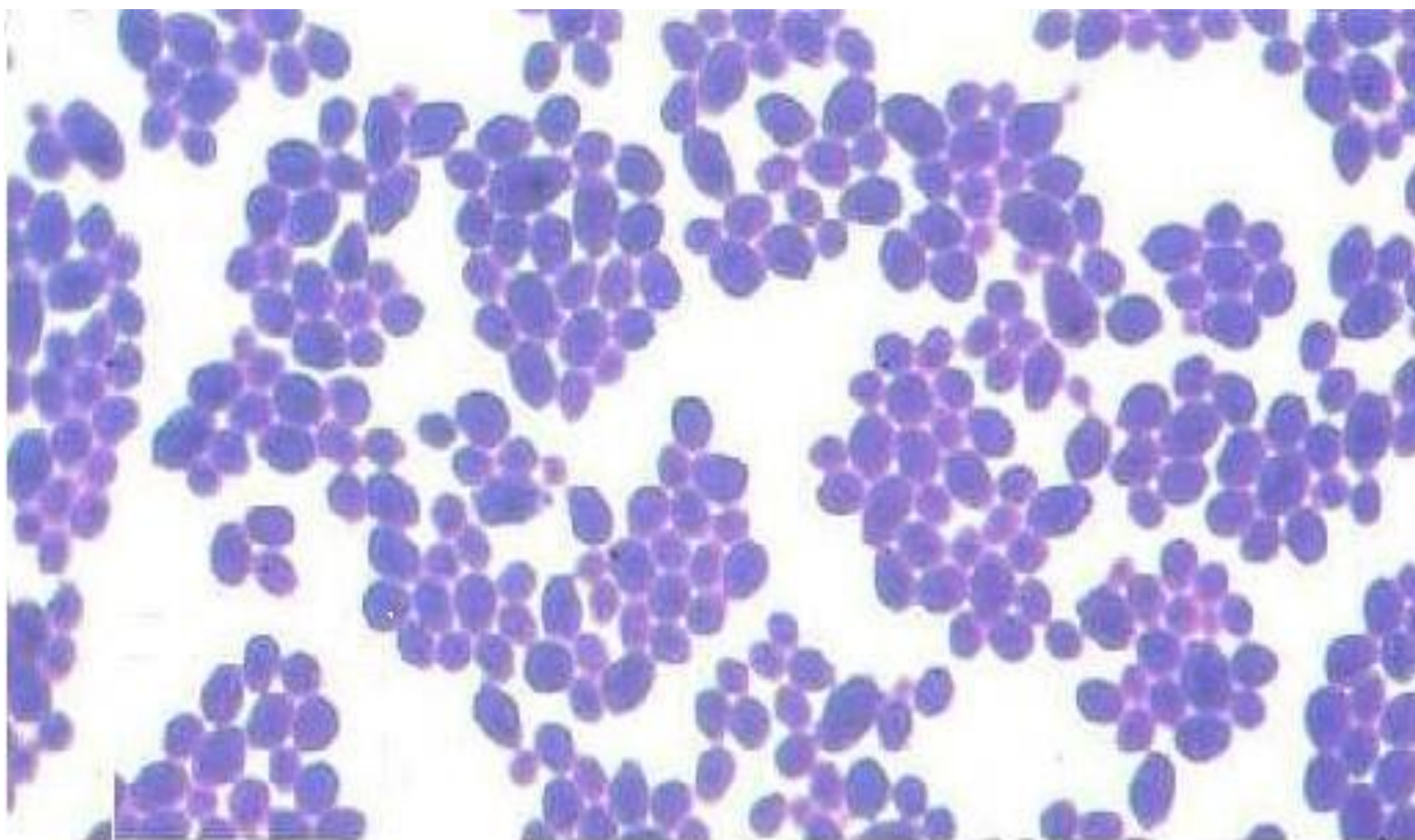
## Egyszerű festés : Metilénkék

1. Kenetkészítés
2. Lehűlés után a festőállványra helyezzük a kenetet
3. Festékoldatot öntünk rá, 1-3 percig hatni hagyjuk
4. Csapvízzel leöntjük
5. Szűrőpapírral leitatjuk
6. Immerziós olajjal, 1000 X nagyítással, emelt kondenzorral vizsgáljuk

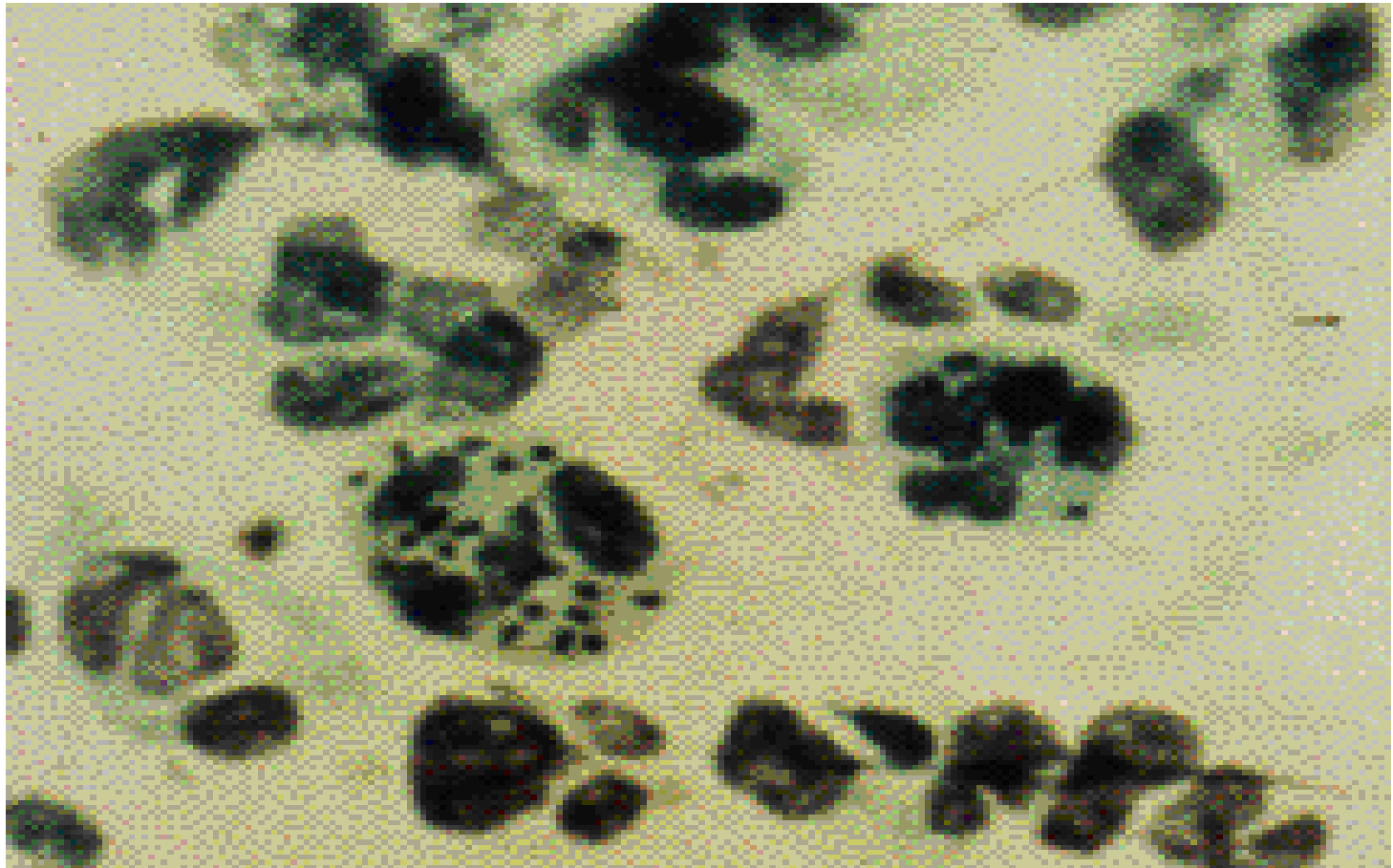
Minden mikroorganizmus kék.



A kenetet zsírtalanított tárgylemezen készítjük el (Cornet-csípőbe fogva többször áthúzzuk a Bunsen láng felett). A baktérium szuszpenziót levegőn szárítjuk, majd a Bunsen láng felett többször áthúzva fixáljuk (a nedves állapotban történő fixálás a mikrobák deformálódásához, rosszul festődő torz alakokhoz vezet!)



**Sarjadzó gomba (*Candida albicans*) egyszerű festéssel (metilénkék) készített kenete**



***Neisseria gonorrhoeae* (egyszerű festés, metilénkék)**

## Gram festés

1884-ben, dán Hans Christian Gram fedezte fel  
(pneumoniában elhalt beteg tüdőszövetét vizsgálva)

Alapvető differenciáló festés:

Gram pozitívak: lila/sötétlila/kék

Gram negatívak:piros



Nem festődnek:

Mycobacteriumok, chlamydia, mycoplasma,  
rickettsia, legionella csak tenyészetből, spirochéták  
túl keskenyek

Festődést befolyásol(hat)ja:

a tenyészet kora, előzetes antibiotikum kezelés,  
intracelluláris elhelyezkedés

Alternatívái:

Japán próba

Bizonyos antibiotikumok iránti érzékenység



## GRAM Festés (összetett festés)

1. Fixált kenetet kristályibolya-Na-oxalát 1:4arányú keverékével 1 percig festünk
2. Leöntjük, csapvízzel öblítjük.
3. 1 percig Lugol oldattal festünk
4. Csapvízzel öblítünk
5. 96%-os alkohollal színtelenedésig csepegtetjük
6. Csapvízzel öblítünk.
7. Carbol-fuchsinnal vagy safraninnal „ellenfestünk”  
(1 perc)
8. Szűrőpapírral szárítjuk
9. Olajimmerzióval vizsgáljuk





kristályibolya  
2 perc



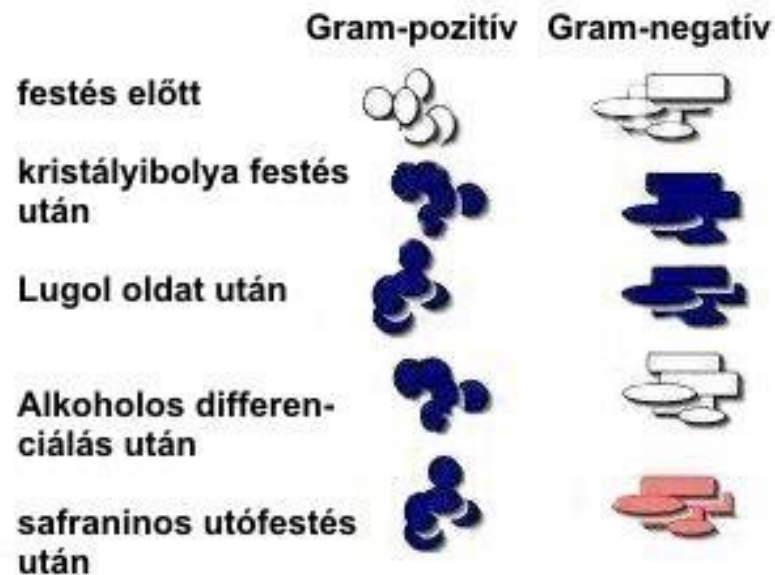
Lugol oldat  
1 perc



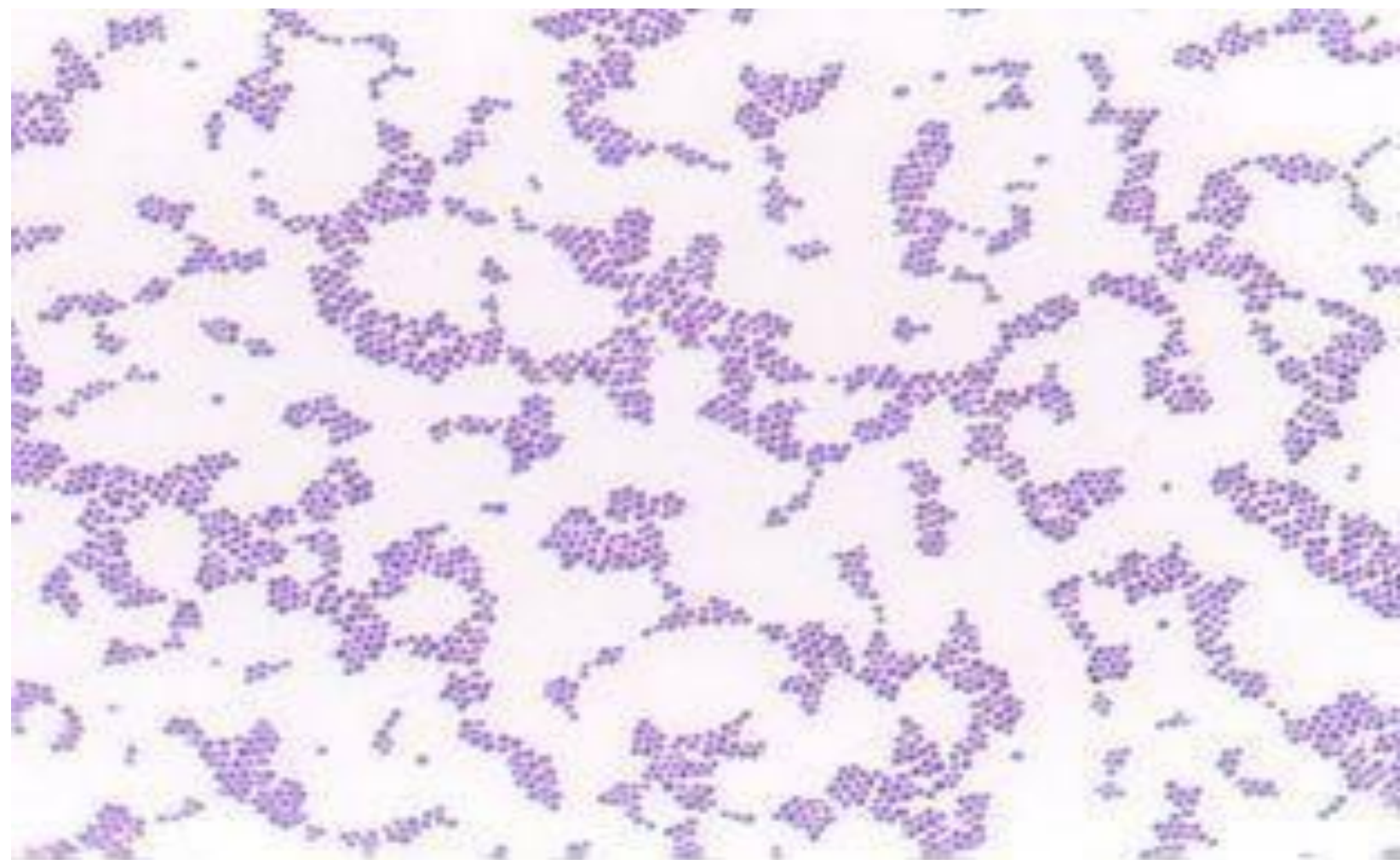
alkoholos  
differenciálás



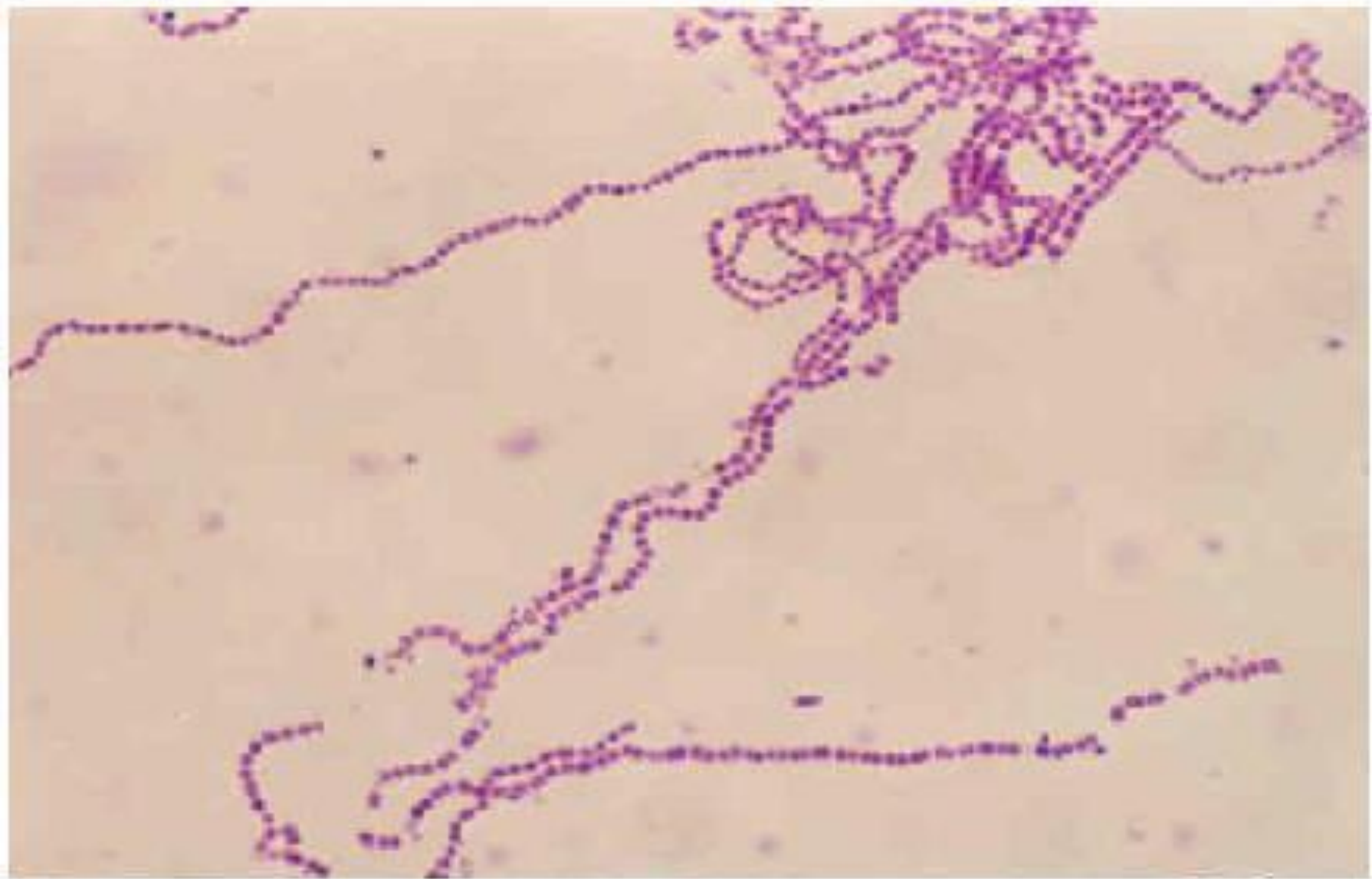
safranin  
2 perc



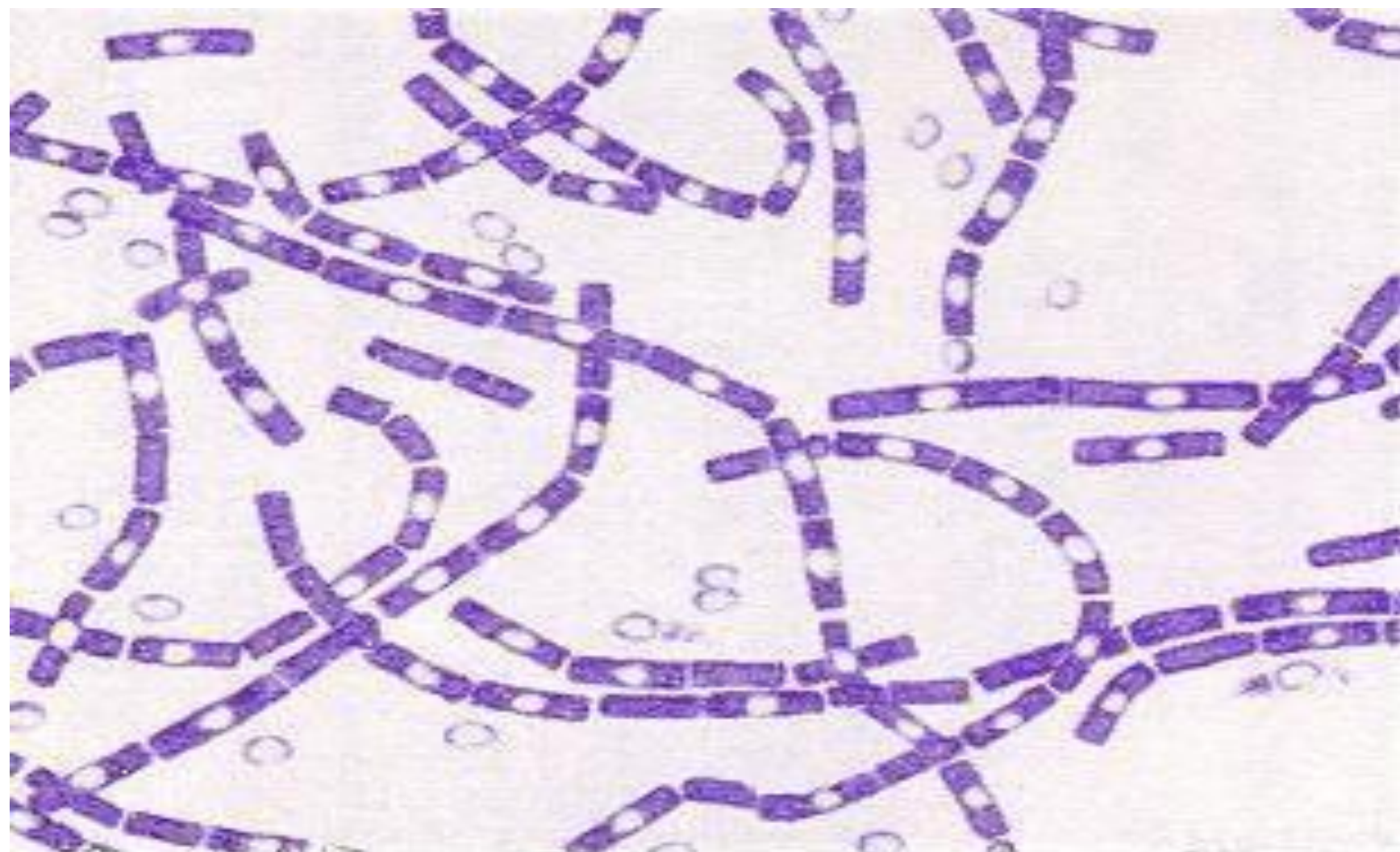
**Gram-festés:** a kristályibolya és a Lugol oldat (KJ-ot tartalmazó jód oldat) egymásra hatásából keletkező jód-para-rozanilint az alkoholos differenciálás kioldja a Gram-negatív baktériumokból (elszintelenednek), ezek az utófestésre használt safranintól piros színűre színeződnek, míg a Gram-pozitívok színe (sötétlila) nem változik



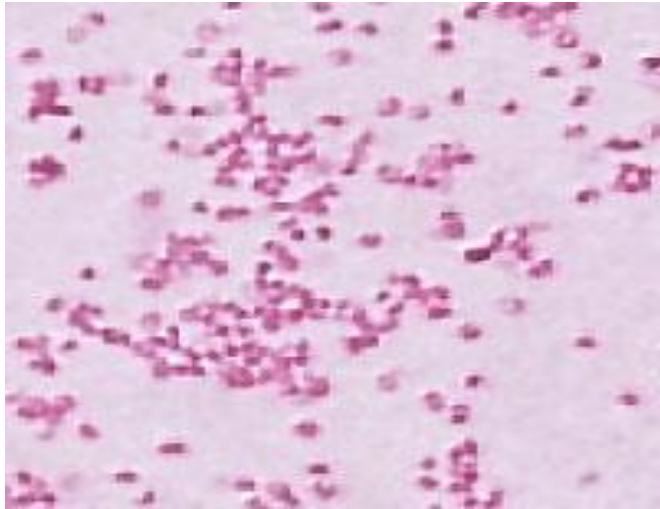
**Gram-pozitív coccusok "szőlőfürt-szerű" elrendezésben (Staphylococcus)**



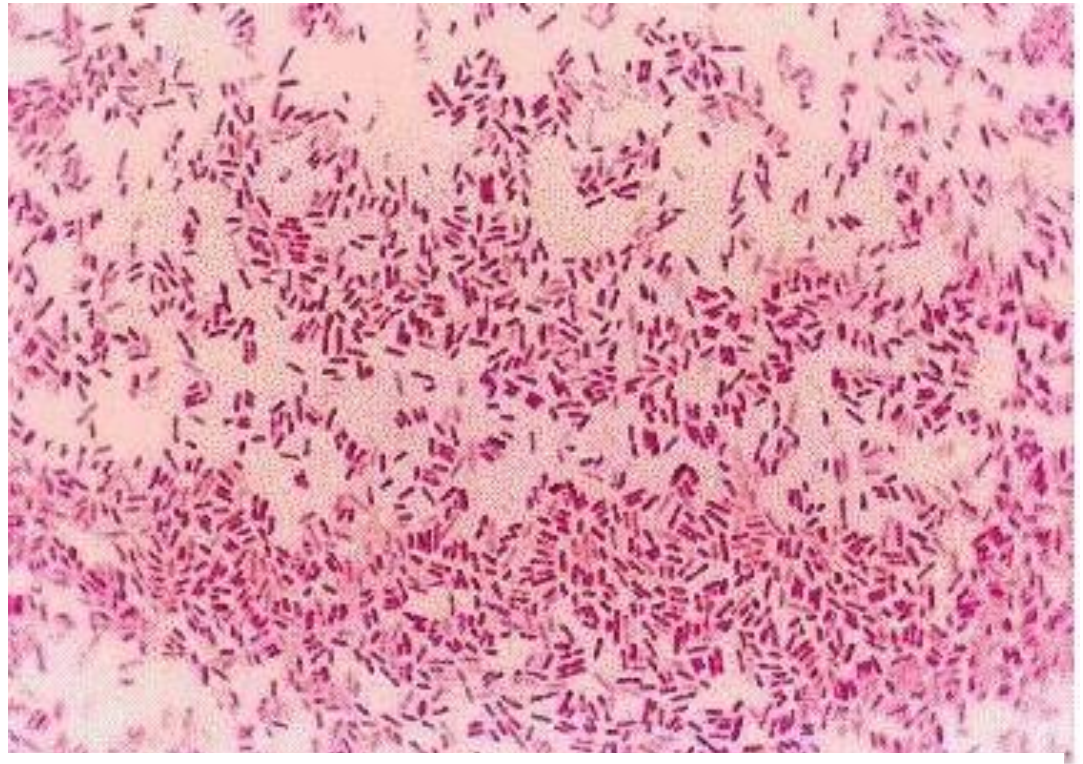
Gram pozitiv coccus (*Streptococcus pyogenes*)



**Gram-pozitív pálca, közepén nem festődő, a baktériumtestet nem deformáló spóra látható (*Bacillus cereus*)**



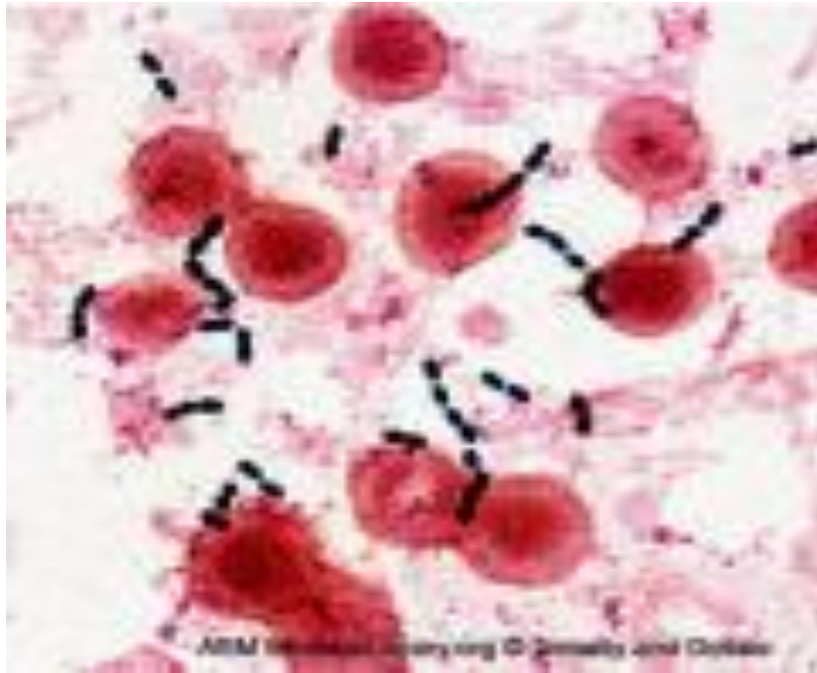
**Gram negatív coccusok**  
(*Neisseriaceae*)



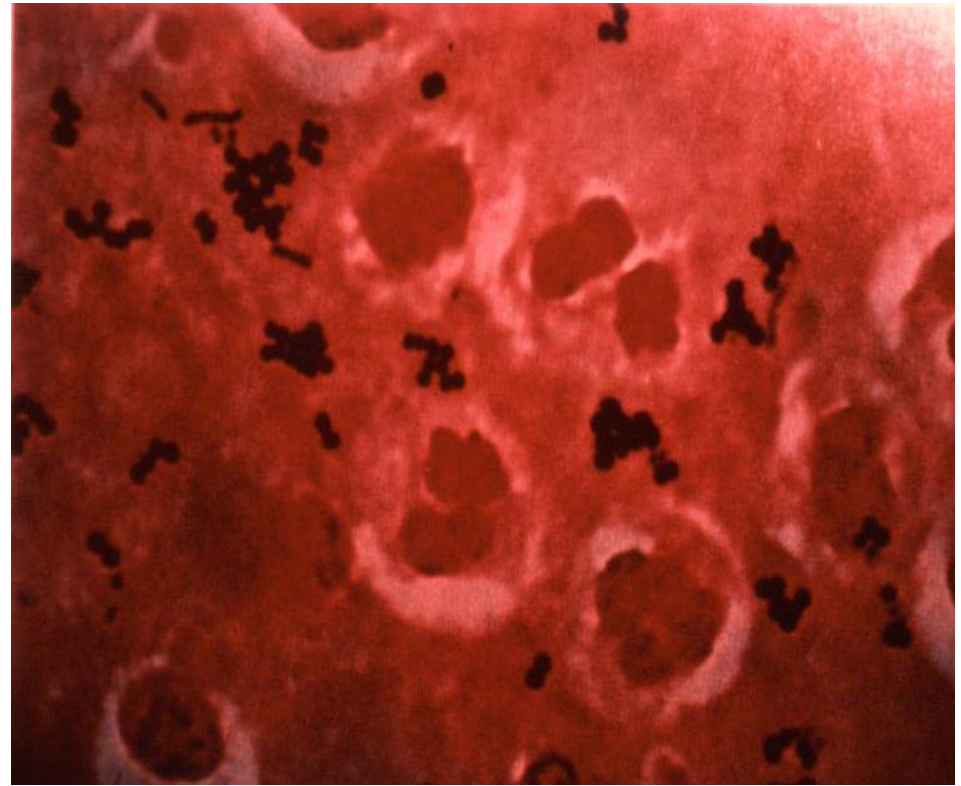
**Gram negatív bacillusok** (*Escherichia coli*)



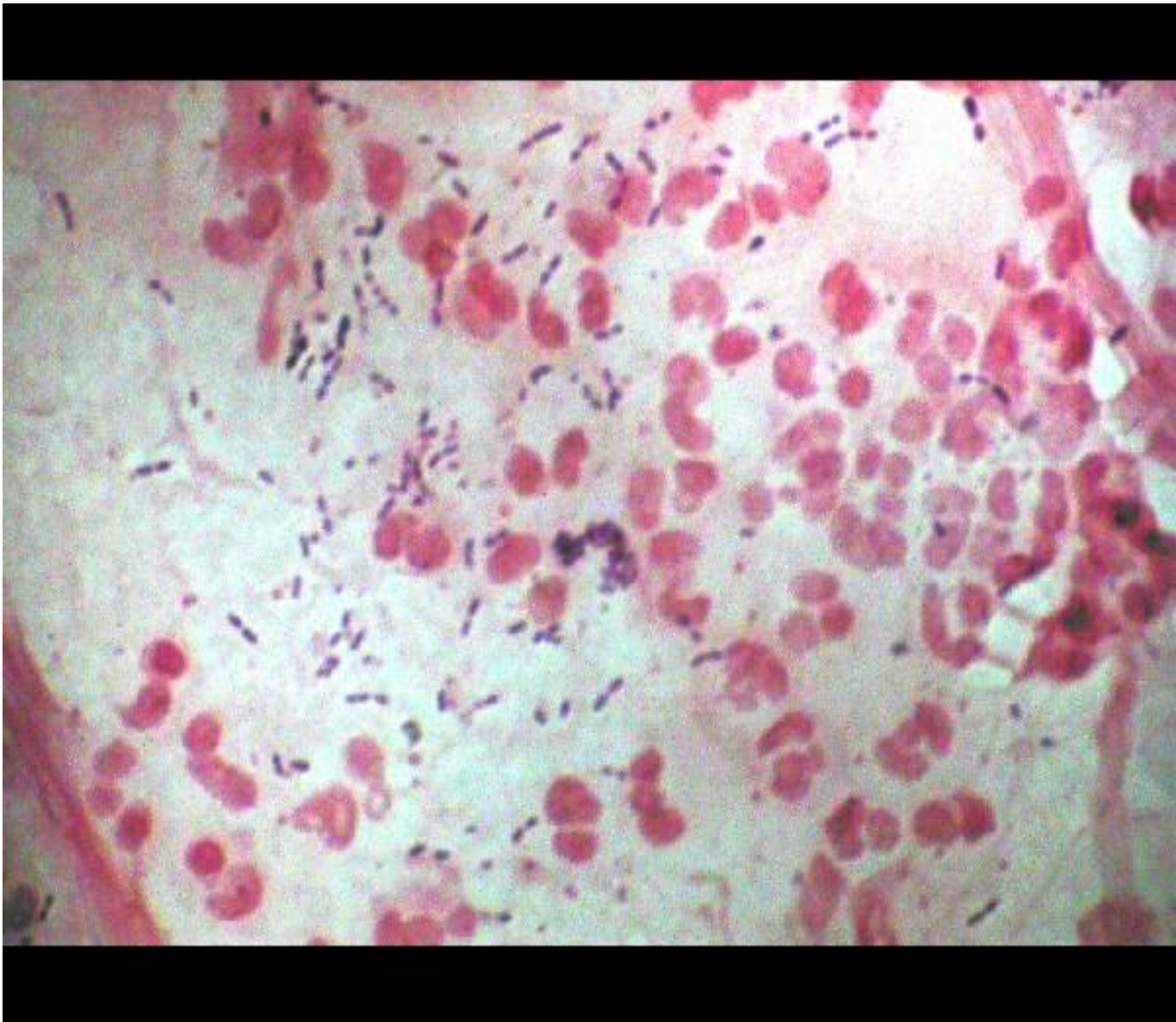
**Gram negatív bacillusok** (*Pseudomonas aeruginosa*)



**Gram pozitív coccus láncok  
hemokultúrában (*Enterococcus  
faecalis*)**



**Gram pozitív coccusok  
szőlőfürtszerű elrendeződésben  
(*Staphylococcus aureus*)**



Gram pozitív diplococcusok köpetben (*Streptococcus pneumoniae*)

## Ad I/e Antigén detektálás

- gyors, egyszerű
- magas szenzitivitású és specificitású (általában)

### 1. Latex agglutináció

- Bakteriális antigének detektálása (elsősorban liquorból!)
  - *S.agalactiae, S.pneumoniae, H.influenzae B, N.meningitidis*
  - *S.pneumoniae, Legionella p.* (vizeletből)
- Gomba antigének detektálása
  - *Cryptococcus neoformans* (liquor, serum)

### 2. EIA (vér, vizelet, liquor, széklet, aspirátum)

- Bakteriális antigének – *S.pyogenes, L.pneumophila1., C.trachomatis*
- Bakteriális toxinok – *Clostridium difficile, Shiga-like toxin E.coli*
- Gomba antigének – *Cryptococcus neoformans*
- Parazita antigének – *G.lambliia, C. parvum, E.histolytica/dispar*
- Vírus antigének – *adenovirus40-41, HSV, RSV, rotavírus, Influa*



## **Ad II/A Tenyésztés**

**- gold standard**

**- lehetővé teszi a fertőző ágens mennyiségi és minőségi értékelését is!**

### **Általában (rutin) használt táptalajok:**

- véres agar, csokoládé agar, Eosin-metilénkék, PEA, CNA

- folyékony tt. (thioglycolát, Holmann)

- anaerob szelektív és nem szelektív tt

### **Speciális táptalajok:**

- Löffler, Clauberg, BCYE, TM, Lewenstein-Jensen, DC, TCBS, Brillant-zöld, Bizmut-szulfid, Korthof, Skirrow, Francis, Bordet-Gengue

### **Tenyésztő környezet biztosítása**

- aerob, emelt CO<sub>2</sub>, microaerophil, anaerob+ páratartalom

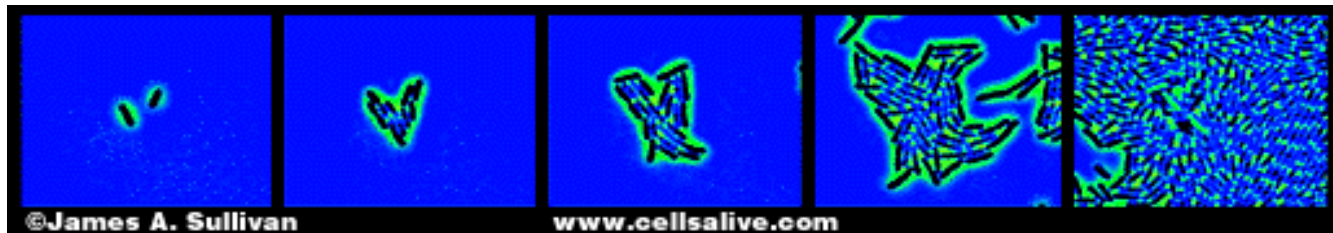
- 25 °C, 37 °C, 42 °C

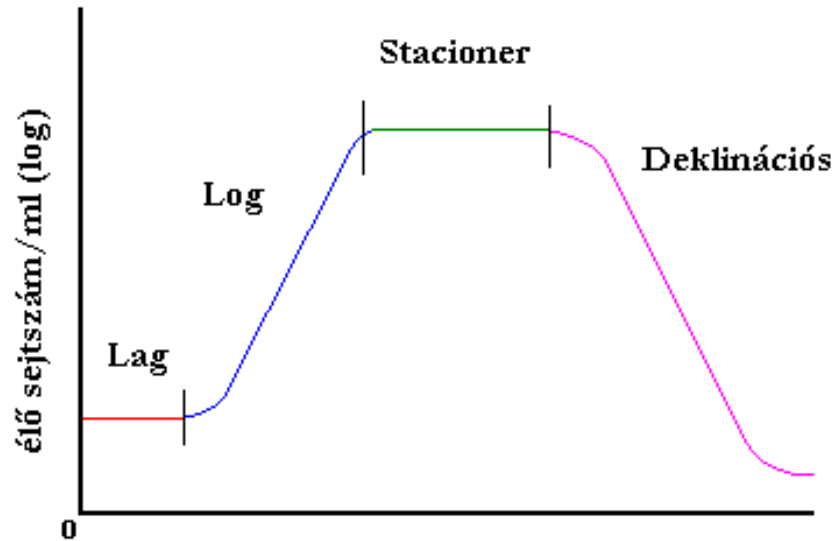
# A baktériumok szaporodása

Baktériumsejt növekszik, majd osztódik  $\Rightarrow$  a populáció szaporodik

- Optimális körülmények esetén a sejt tömeg (sejtszám) exponenciálisan nő az idővel
- Generációs idő: az az idő, ami alatt a biomassza tömege a 2x-esére nő  
ált. 20-40 perc (de pl. *M. tuberculosis*: 20 óra)

valóságban zárt tenyészetben a **szaporodási görbe** írja a sejtszám-változást





- **lag/adaptációs fázis:** alkalmazkodás az új környezethez, felkészülés az osztódásra
- **log/exponenciális fázis:** ideális szaporodás, mértéke a fajra jellemző
- **stacioner fázis:** élő csíraszám állandó, osztódás = pusztulás a tápközeg kimerül, toxikus termékek szaporodnak fel
- **hanyatló/deklinációs fázis:** élő csíraszám csökken, majd az autolízis miatt az össz-csíraszám is

# A baktériumok tenyésztése

**Táptalaj:** in vitro optimális feltételek biztosítása

- Megfelelő összetétel, vegyhatás, ionkoncentráció
- Optimális hőmérséklet
- O<sub>2</sub> jelenléte vagy hiánya



**I. Összetétel:** H<sub>2</sub>O, C, N, sók, nyomelem, natív fehérje,

a) **pH:** optimális 7,2- 7,4

Kivétel: pl. *Vibrio cholerae* – pH: 8-9. *Lactobacillus* - pH: 5,4- 6,6

b) **ionkonc.:** mikróbák toleránsak

**halofil:** pl. *Staphylococcus aureus* 7% NaCl

**II. Hőmérséklet:** mezofil 30 - 37 °C

termofil > 50 °C

pszichrofil < 20 °C

pl. *Listeria monocytogenes* 4 °C – hűtőben is szaporodik

### III. O<sub>2</sub> jelenléte vagy hiánya:

- **obligát aerob:** *Pseudomonas aeruginosa* (respiráció)
- **obligát anaerob:** Clostridiumok (fermentáció)
- **fakultatív anaerob:** *E.coli* (mindkét lehetőség, humán patogének többsége)
- **microaerophil:** *Campylobacter* (alacsonyabb oxigén tenzió)
- **capnophil:** *Haemophilus influenzae*  
emelt széndioxid szint



# Táptalajok készítése

**pepton:** aminosav, polipeptid forrás

**húskivonat:** N, növekedési faktor, szénhidrát

**agar-agar:** tengeri moszat kivonat

szilárdításhoz kell 0,5- 2%-ban

nem tápanyagforrás

vízmegekötés: súlyának 100x-t

95 °C-on olvad

45 °C-on dermed



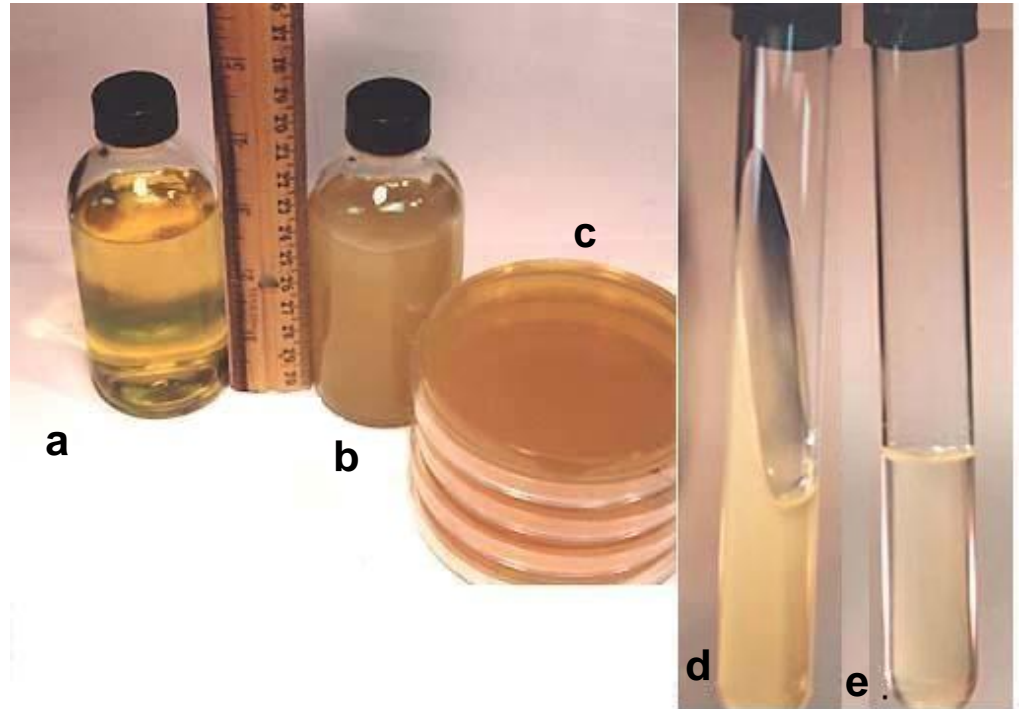
# Folyékony táptalaj (bouillon)



Szálás (a) és porított (b) agar-agar

## Agar-agar táptalajok

- a. folyékony (98°C)
- b. dermedt (40-42°C)
- c. agarlemez
- d. ferdeagar
- e. magasagar



# Táptalajok felosztása

**I. Természetes:** tej, epe, burgonya

**II. Mesterséges:**

**1) Egyszerű táptalajok:**

**1.1. Folyékony** - húsleves, bouillon

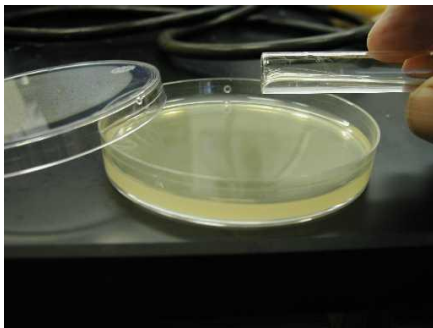
**1.2. Szilárd** – agar-agar tartalmaznak

- agar lemez: 2% agar-agar tartalmazó bouillon

- véres agar: 5% defibrinált marhavérrel dúsított

igényes baktériumok (haem)

haemolízis is látszik

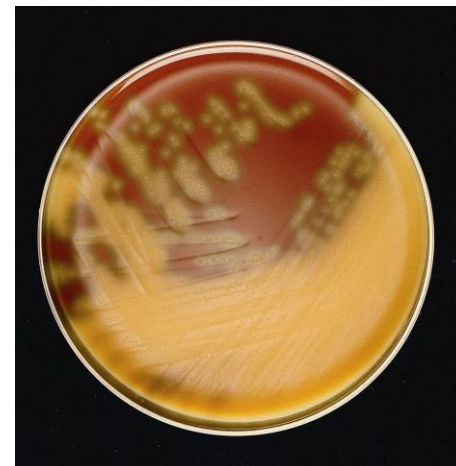
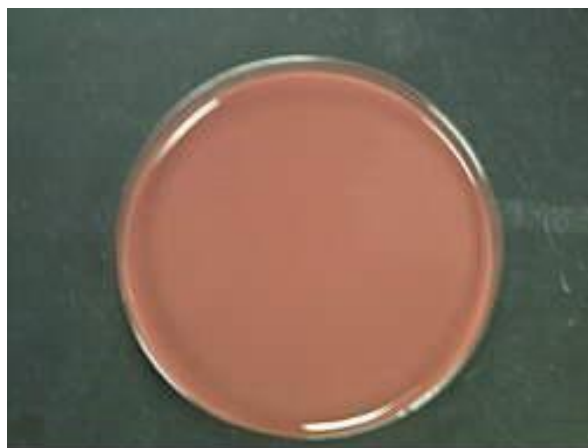






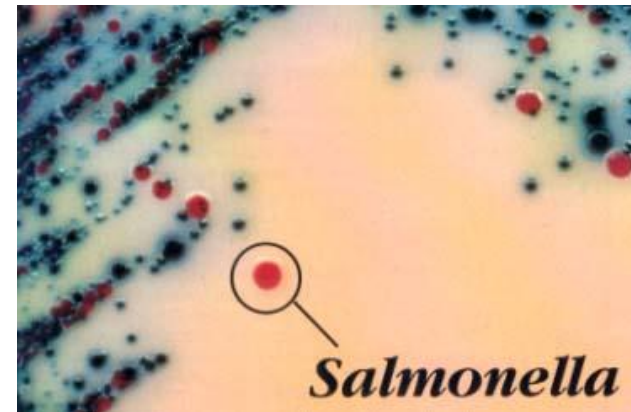
A, B:  $\beta$ -hemolysis, C:  $\alpha$ -hemolysis

- csokoládé agar: hőkezelt véres agar  
még igényesebb baktériumoknak ( pl.  
Haemophilus)  
haemet és NAD-ot is tartalmaz  
csak az  $\alpha$ -haemolízis (zöld) látható
- ferde agar: törzsfenntartásra szolgál  
nehezebben szárad ki  
oltókacsot használunk hozzá
- magas agar: alul anaerob körülmények



## 2) Összetett táptalajok:

**2.1. Differenciáló** - kül. tulajdonságú baktériumok eltérő morfológiát mutatnak rajta  
pl.: laktóz bontás kimutatása



## 2.2. Szelektív

bizonyos baktériumok növekedését elnyomjuk pl. antibiotikum hozzáadásával

szelekciós előny biztosítása a normál flórával szemben

pl. Vancomycines csokoládé agar – *H. influenzae*

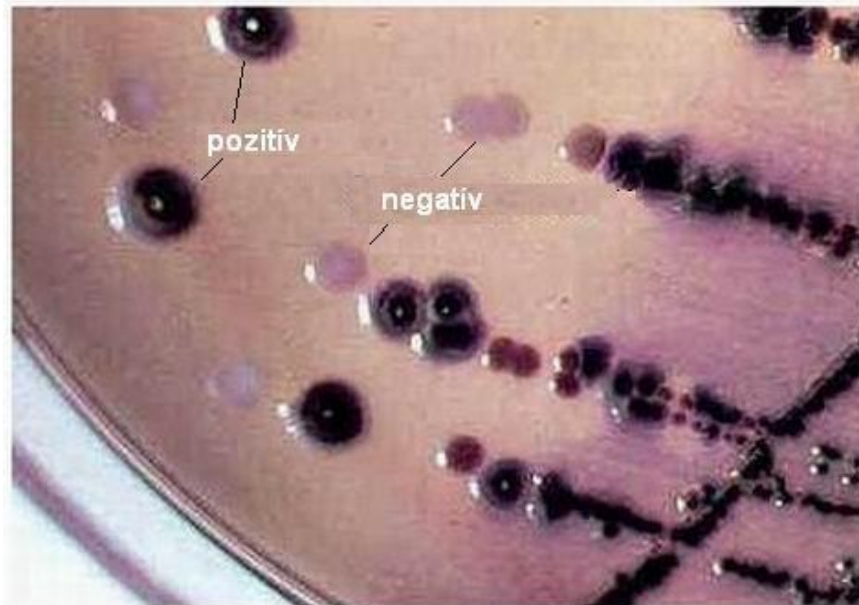


## 2.3. Szelektív – differenciáló

**Eozin-metilénkék táptalaj:** szelektív – csak a Gram negatív baktériumokat engedi kinőni  
differenciáló – laktóz bontás alapján

L + : sötét lilás telepek

L - : világos rózsaszín telepek



Differenciáló táptalaj (EMB táptalaj: eozint, metilénkéket és laktózt tartalmaz. A laktózbontó baktériumok telepei kékeslilák, a laktózt nem bontó baktériumok telepei színtelenek)

### 3) Transzport táptalaj:

tubusba zárt műanyaglemezzel, 2 oldalán táptalajokkal  
szállításakor a baktérium már szaporodni tud (tenyésztés)!

pl. Uricult-Plus



### 4) Hemokultúra táptalajok:

palackban tápanyagokban gazdag folyékony táptalaj  
ebbe veszik a vért tenyésztés céljára



# Tenyésztés feltételei:

## 1. Aerob baktériumok:

37 °C termosztátban

70-80% -os páratartalom

O<sub>2</sub> jelenléte (respiráció)

1 atm.

## 2. Anaerob baktériumok tenyésztése:

O<sub>2</sub> hiányában – fermentáció

### 2.1. Fizikai módszer

Anaerosztát: **vákuummal eltávolított levegő és CO<sub>2</sub> gázkeverék**

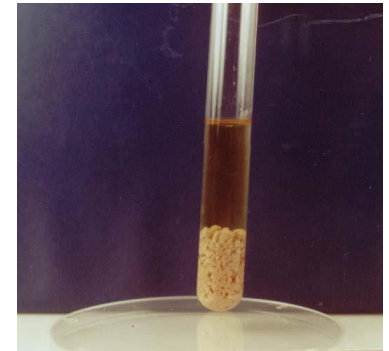


Az anaerosztátból a levegőt eltávolítjuk (kiszívjuk), szükség esetén inert gázzal (nitrogén) feltölthetjük. A vizsgálandó anaerob baktériumokat táptalajra oltva a készülékbe helyezük és inkubáljuk.

## 2.2. Kémiai módszerek

### 2.2.1. Folyékony táptalajok (szerv bouillonok)

- 10-20 perces főzéssel kiűzhető az  $O_2$
- leoltás után steril paraffinnel fedni a tenyészetet
- félfolyékony táptalajban az  $O_2$  nehezen diffundál be
- redox potenciál csökkentése  
pl. Holman – húsdarabok

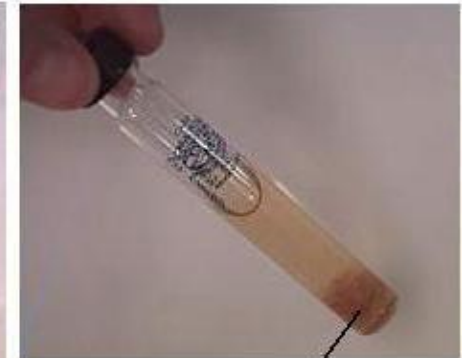


### 2.2.2. Tioglikolát tart. bouillon

redox potenciál csökkentése



elnyelt  
oxigén  
anaerob  
réteg  
Rezazurint és  
dextróz tartalmazó  
táptalaj



Főtt húst tartalmazó (Holmann)  
táptalaj

Anaerob tenyésztésre szolgáló  
táptalajok

### 2.2.3. Gaspack anaerosztát

légmentesen záródó műanyag henger  
palládium katalizátor és hidrogént felszabadító elegy van benne

**Palládium katalizátor**

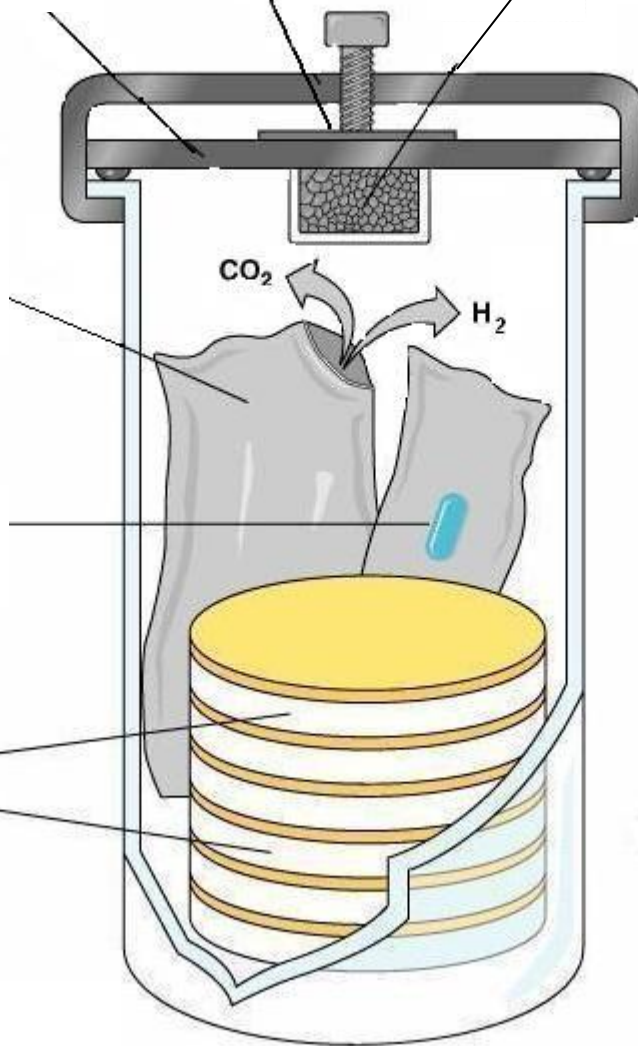
**Fedél tömítéssel**

**Fedél leszorító**

**Nátrium-bikarbonátot és  
nátrium borohidrátot  
tartalmazó tasak**

**Anaerob indikátor  
(metilénkék)**

**Petri csésze**



**Anaerob tenyésztés (GasJar)**



**3. Microaerophil baktériumok:** 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>

tenyésztés csökkentett O<sub>2</sub>, emelt CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában

pl.: Campylobacter jejuni

**4. Capnophyl baktériumok:**

tenyésztés növelt CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában - 5-7% CO<sub>2</sub>

pl.: Neisseria, Haemophilus

# A baktériumok növekedésének makroszkópos vizsgálata

**Telep (kolónia):** szilárd táptalajon a baktérium megjelenése  
/folyékony táptalajban zavarosodás vagy  
hártya képződik/

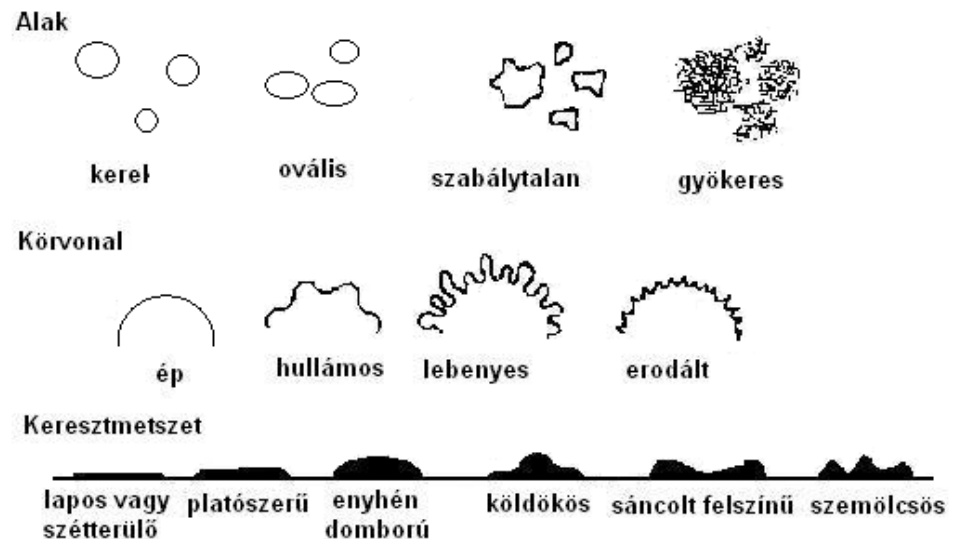
## Telepmorfológia megítélésének szempontjai:

nagyság, alak, színe, felszíne, széle, áttetszősége,  
konzisztencia

- **szaga:**

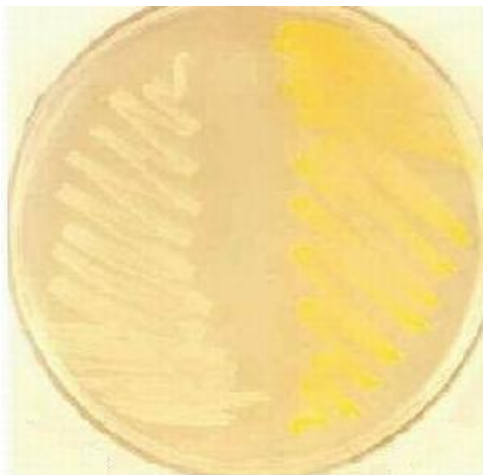
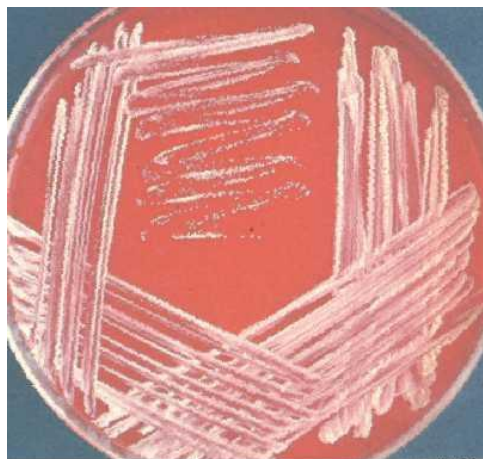
*Pseudomonas* –  
hársfavirág illat

*H. influenzae* –  
náthás orrváladék szag



**- pigmentképzés:**

a) zsírodékony pigment – telep színe (pl. *S. aureus*)



b) diffúzibilis, vízoldékony pigment – egész táptalajt elszínezi  
pyocianin – *Pseudomonas aeruginosa*



**- haemolízis véres agaron:**

$\alpha$ -haemolízis: részleges hemoglobin lebontás – zöld udvar

$\beta$ -haemolízis: teljes vvt. (hemoglobin) lebontás – áttetsző udvar

$\gamma$ -haemolízis: nem termel hemolizint a baktérium – nincs hemolízis



Hemolízis véres agar táptalajon (a: beta-hemolízis, b: alfa-hemolízis, c: gamma-hemolízis)

**- rajzás:**

peritrich csillós baktérium (Proteus)

összefüggő tenyészet, nincs izolált telep



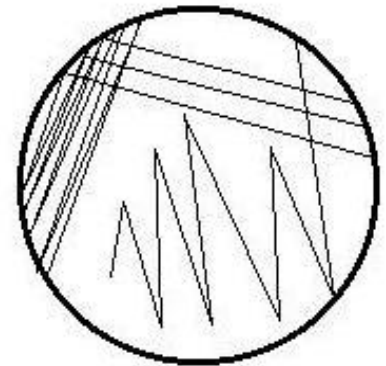
# A baktériumok tenyésztésével kapcsolatos alapfogalmak

- **Inokuláció, beoltás:** kis mennyiségű baktérium steril táptalajba juttatása

- **Inokulum:** beoltásra használt baktérium mennyiség

- **Szélesztés:**

- 1) izolált telep nyérése – indentifikáláshoz  
("3 lépéses technika")



- 2) "baktérium pázsit" - rezisztencia vizsgálathoz

- **Színtenyészet:** egyetlen faj sejtei alkotják

- **Átoltás:** valamely mikroorganizmus tenyészetből sejteket viszünk át steril táptalajra, hogy tenyészetet hozzunk létre

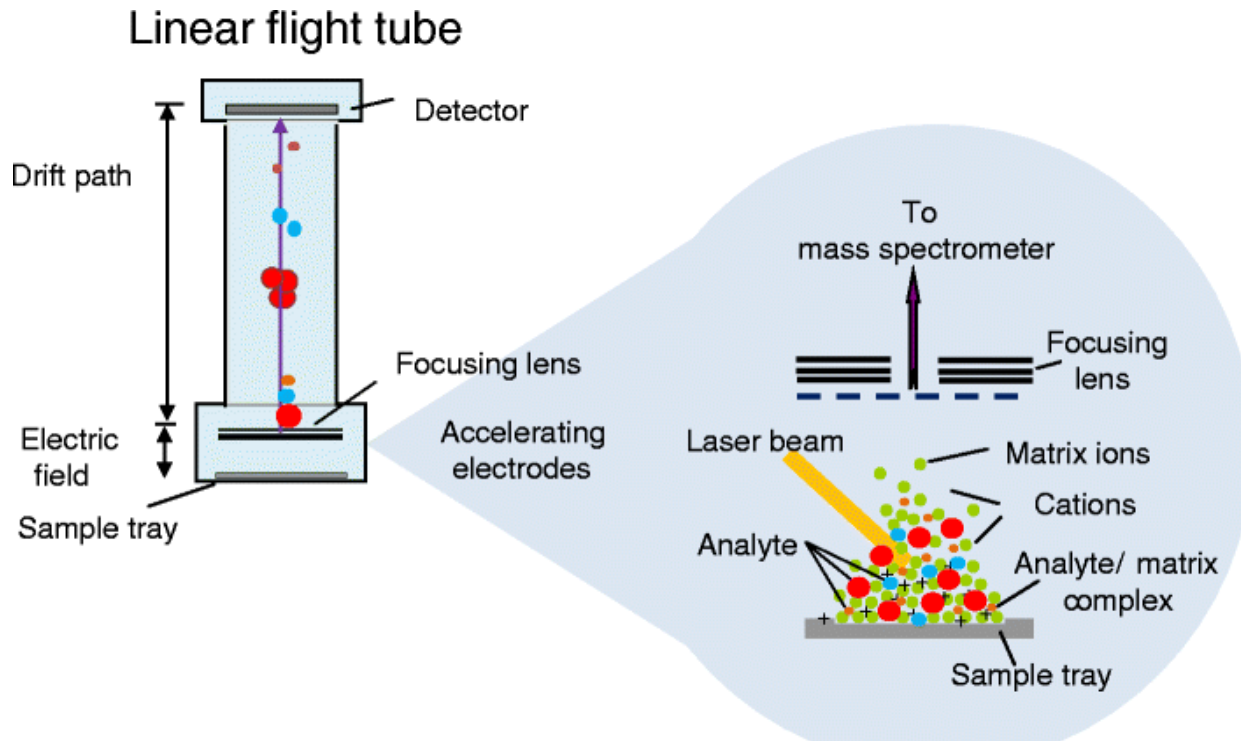
## ***Vizsgálatok időigénye***

<b>Diagnosztikai módszer</b>	<b>Vizsgálat ideje</b>
Mikroszkóp	1-5 perc
Gram-festés	Gram +/- eredmény 10-20 perc
Tenyésztés, identifikálás	1 nap-hetek
Tömegspektrométer	tenyésztés után pár perc alatt azonosítás
In vitro érzékenységi vizsgálat	1 nap-hetek
Savópár antitest vizsgálat	2-4 hét
Monoklonális antitestek vizsgálata	órák
Antigén detektálás	percek-órák
RT PCR (mikróba azonosítás, egyes R gén)	1- néhány óra

# Kórokozó gyors azonosítása – tenyésztés után

- Hagyományos gyors tesztek
  - Virulencia faktor, biokémiai tulajdonság vizsgálatán alapuló
    - Koaguláz teszt (pl. *S. aureus*)
    - Lancefield szerinti szerotipizálás (pl. *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, D csoport)
    - PYR teszt (pl. *S. pyogenes*, Enterococcus)
    - tokantigének azonosítása (pl. *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*)
- Automata identifikáló rendszerek (pl. VITEK, Phoenix)
  - Nagyszámú biokémiai vizsgálat végzése, eredmények számítógépes értékelése
- Immunofluoreszcens próbák
  - Simplex, kórokozó specifikus (pl. Legionella)
  - Multiplex (?) (pl. **PNA FISH** – pozitív hemokultúrás palackok vizsgálata)
- **Tömegspektrométer – MALDI TOF**
- Molekuláris (kórokozó specifikus PCR, 16S rRNS, szekvenálás)

# MALDI-TOF MS



Bruker



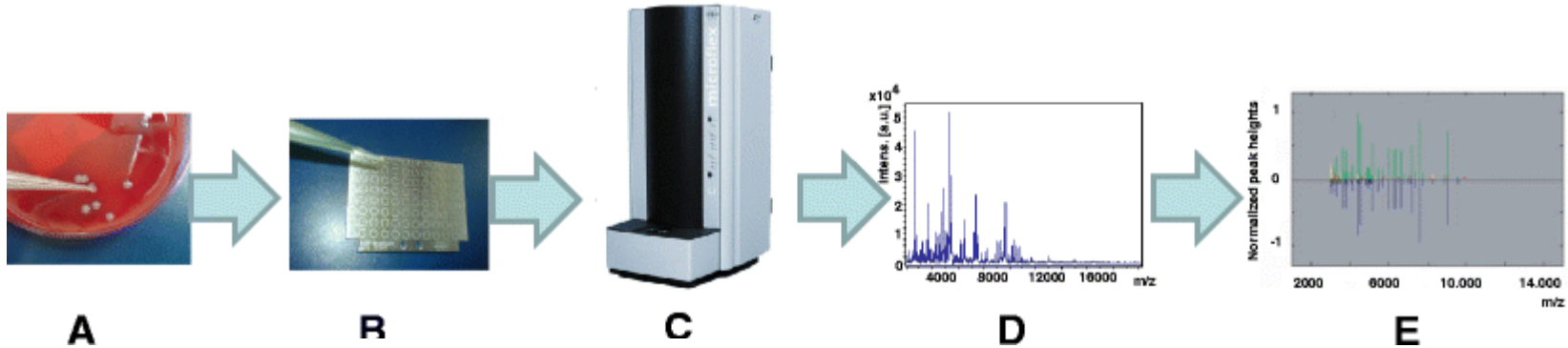
Shimadzu

**MALDI-TOF MS = matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry**

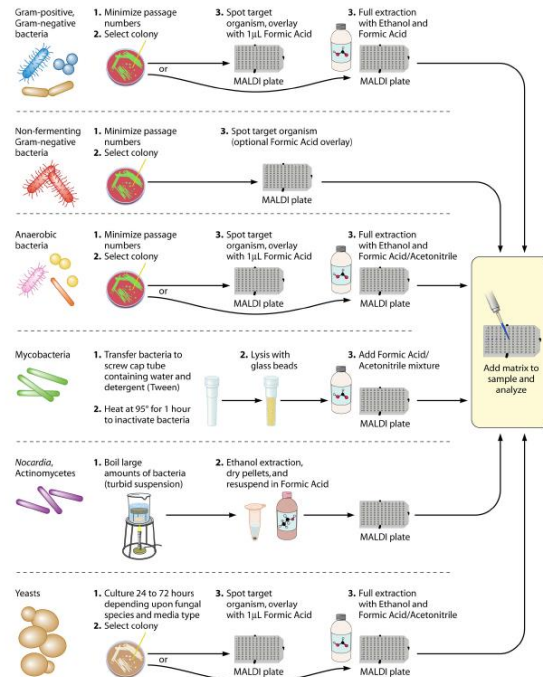
**Riboszomális és egyéb proteinek analízise – jellemző az adott speciesre**



# MALDI-TOF MS vizsgálat folyamata



10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU



Ranking	Species Identification	Score Value	NCBI Code
1 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 17050 DSM	2.298	1352
2 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1_CHB	2.297	1352
3 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.206	1352
4 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 13589 DSM	2.116	1352
5 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2146 DSM	2.093	1352
6 (++)	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2918 DSM	2.008	1352
7 (+)	<i>Enterococcus faecium</i> PX_21086109_III MLD	1.949	1352
8 (+)	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 6177 DSM	1.862	1352
9 (+)	<i>Enterococcus faecium</i> VRE_PX_16086218 MLD	1.83	1352
10 (+)	<i>Enterococcus mundtii</i> DSM 4840 DSM	1.739	53346

FIG 3 Additional suggestions for MALDI-TOF MS sample preparations for use with different classes of microbes. Different groups of microorganisms vary fundamentally in their cellular composition and architecture. These differences have been demonstrated to affect the quality of spectra generated during MS experiments and, thus, the accuracy of MALDI-TOF MS-derived identifications. As such, investigators from a number of independent studies have evaluated different methods for sample preparation of different groups of microorganisms, ranging directly from intact-cell to full-protein-extraction-based methodologies. Results from these studies are summarized here. Proper biological safety precautions should be followed with respect to dangerous members of these groups of organisms.

TAT: 5-7 perc

# MALDI-TOF MS – a forradalmi újítás

- MALDI-TOF MS = matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry
- A baktériumok, gombák identifikálása **gyors, egyszerű**, az eredmény **pontos** (többnyire a DNS szekvenálással egyenértékű)
  - Rutin mikrobiológiai laborban izolált mikróbák 93 – 96 %-nál egyéb vizsgálatokkal egyenértékű eredmény
- A rutin biokémiai vizsgálatokkal nem vagy nehezen azonosítható baktérium, gomba fajok is identifikálhatók
  - Koaguláz-negatív staphylococcusok
  - Nem-fermentáló mikróbák
  - Streptococcusok
  - Anaerob baktériumok

# MALDI-TOF MS – a forradalmi újítás

## Jelen korlátai

- a tömegspektrum könyvtár hiányossága
- a közeli fajok nagyfokú hasonlóságot mutató tömegspektruma
  - *S. pneumoniae/S.mitis-oralis*
  - *E. coli/Shigella spp.*
- egyes baktériumoknál az összetett sejtfal szerkezet miatt nehezen feltárható fehérje állomány - Speciális előkezelési protokollok
  - Gombák, mycobacteriumok, nocardiók

Szükségessé tehetik egyéb identifikáló módszerek (biokémiai vagy molekuláris) használatát

## Ad II/C Antibiotikum érzékenység vizsgálata

- A modern antibiotikum alkalmazás elve: hatékony, magas koncentrációt biztosító antibiotikum adása a lehető legrövidebb ideig
- Az antibiotikum alkalmazás valójában csak szelektál
- Egyes baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának ismerete
- Legfontosabb rezisztencia mechanizmusok:
  - atb.-t hasító, modifikáló enzimek termelése
  - atb.kötőhely változása
  - sejt permeabilitás csökkenés
  - efflux
- Egyszerre 2-3 rezisztencia mechanizmus is jelen lehet
- Az antibiotikum hatását egy baktériummal szemben az un. minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával jellemezzük

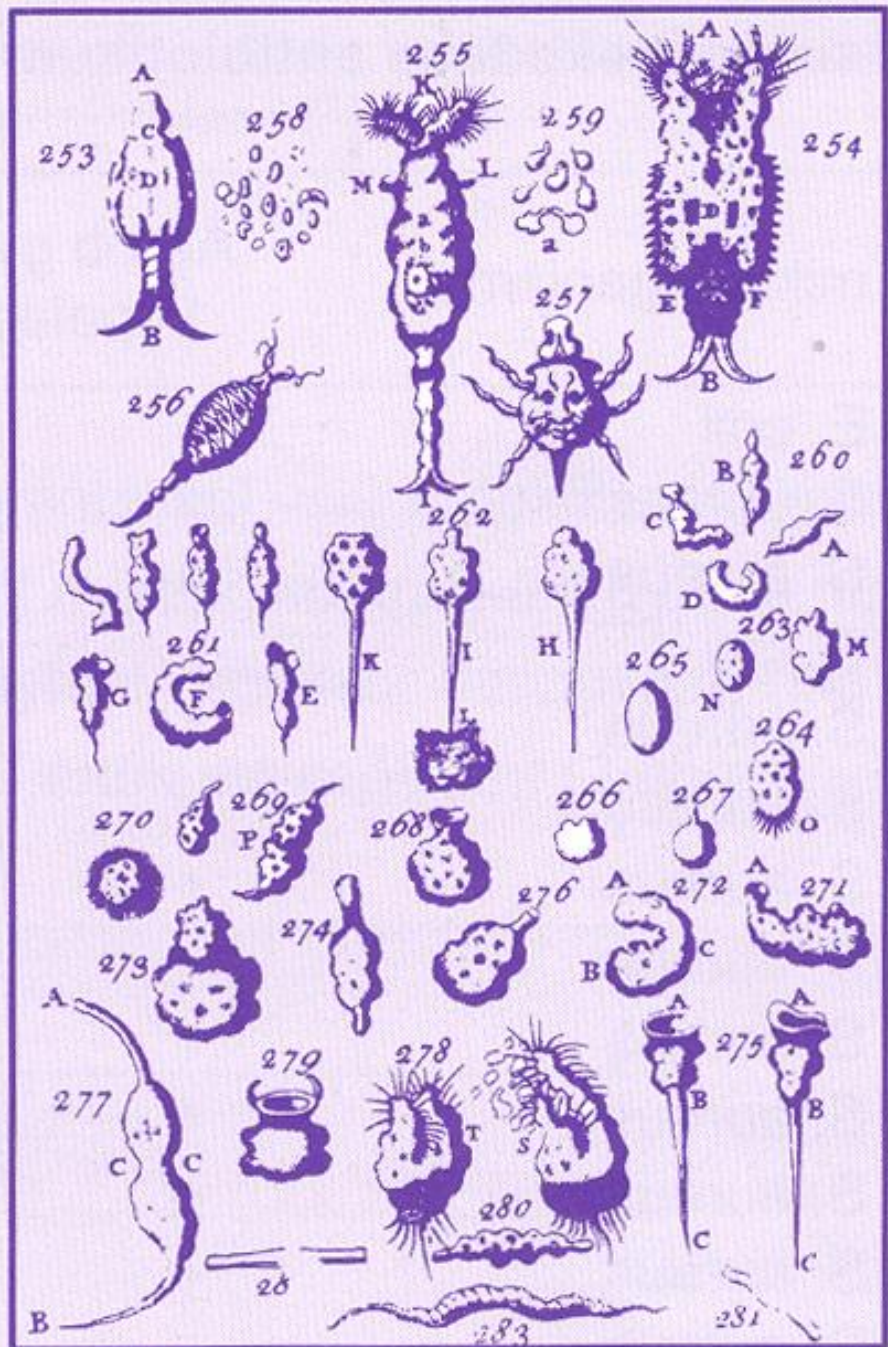
## **Miért kell rezisztencia vizsgálatot végeznünk:**

- az adott folyamatban kórokozónak tartott baktérium nem vált-e **másodlagosan rezisztenssé** azzal/azokkal az antibiotikumokkal szemben, amelyek a szakma általánosan elfogadott álláspontja szerint klinikailag az ajánlott antibiotikumok közé tartozik

## **Rezisztenciára utaló fenotípusos jegyek vizsgálata a rutin diagnosztikában**

- MIC
- korongdiffúzió
- rezisztencia mechanizmus közvetlen kimutatása





Köszönöm a figyelmet!