

**Orvosi mikrobiológia gyakorlatok III. éves ÁOK hallgatók részére
2020/2021-es tanév, I. félév**

1. hét **Szept. 09, 10, 11**

1. Bevezetés: A tárggyal kapcsolatos tudnivalók. Mikrobiológiai laboratóriumok felépítése, szervezése, típusai. A **fertőző laboratóriumi munka szabályai, eszközei. Tűzvédelmi és munkavédelmi ismeretek.** Jegyzőkönyvek kitöltése és aláírása.

2. Mikroszkópos morfológia, a mikroszkópos vizsgálatok információtartalma

Elvégzendő feladatok:

A. Natív készítmények

Laposcsepp és függőcsepp

- baktérium (*Proteus*), gomba (élesztő) szuszpenzióból és szénaázalékból

Vitális festés – élesztő szuszpenzióból

B. Festett készítmények

Kenetkészítés

- *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*

Egyszerű festés (metilénkék) - *C. albicans*

Gram-festés

- *E. coli*, *S. epidermidis*, *B. cereus*

Mintakenetek: *Klebsiella pneumoniae* tokfestés (tus) és Gram pozitív + Gram negatív baktériumok „vegyes” kenet

Feladat: Saját és mintakenetek értékelése: mikroszkópos morfológia leírása

A baktériumok tenyésztése I.: Tenyésztés és telepmorfológiai vizsgálatok

1. A bakteriológiai táptalajok készítésének szabályai
Folyékony és szilárd táptalajok, transzport közegek és táptalajok, dúsító táptalajok
Táptalajok bemutatása: **dextrózos bouillon, húsos dúsító**, baktériumok növekedése folyékony táptalajban
2. Az **aerob és anaerob tenyésztés paraméterei, eszközei (anaerostat, viasz (thioglikolát, Holman) lezárás, kémiai módszerek** (gas-pack rendszerek CO₂, H₂/CO₂)
3. Baktériumok tenyésztése kísérleti állatokban és élő sejteken
4. Differenciáló, szelektív táptalajok fogalma
Laktózbontás vizsgálata - **eozin-metilénkék** táptalaj
5. A **színtenyészet, izolátum** és a **törzs** fogalma, készítésének módszerei.
6. A transzport közegek és transzport táptalajok fogalma (Stuart transzport közeg)
7. Telepmorfológiai vizsgálatok
8. A csíraszám, telepképző egység (CFU) fogalma, meghatározásának különféle módszerei

Elvégzendő feladatok:

- Táptalajok öntése: szálas agar bemutatása, alkalmazásának oka, magas- és ferdeagar, agarlemez, valamint véres- és csokoládéagar
- Az átoltás gyakorlása bouillonba, agarlemezre, ferde-, magasagarra: *S. epidermidis*, *E. coli* tenyészetből

Mintatenyészetek: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* (agar, véres agar); *Streptococcus pyogenes*, *S. mitis*, *S. pneumoniae* (véresagar); *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *P. aeruginosa*, (agarlemez); *H. influenzae* (csokoládéagar).

Feladat: A gyakorlati terem levegő-csíratartalmának vizsgálata véresagar táptalajon (4 db véres agar lemez, 2 db 5' nyitva, 2 db 60' nyitva, majd inkubálás 20°C, 37°C-on.

Előző heti mintatenyészet átoltságok makroszkópos értékelése, telep morfológia leírása

1. Sterilizálás

- A./ Köznapi, kórházi és laboratóriumi fertőző anyagok keletkezése, kezelése, tárolása, jelzése, megsemmisítése
- B./ Sterilizáló módszerek bemutatása
 - (a) Kémiai (**gázsterilizálás, plazmasterilizálás**)
 - (b) Fizikai (**száraz hő, forró telített vízgőz (autokláv), γ -sugárzás**)
 - (c) A prionok inaktiválásának paraméterei
- C./ **Baktériummentesítés szűréssel**
- D./ Sterilizátorok helyes működésének és a sterilezés hatékonyságának ellenőrzése:
 - (a) Fizikai: a sterilizálás paramétereinek monitorozása (hőmérő, manométer)
 - (b) Kémiai (festékek, szalagok)
 - (c) Biológiai (*Bacillus spp.* spórák)

2. Dezinficiálás

- A./ **Kéz- és bőrfertőtlenítés módszerei** (higiénés kézfertőtlenítés, sebészi bemosakodás, az operációs terület fertőtlenítése)
- B./ Dezinficiensek (táblázatok és kémcsövek)
- C./ **Orvosi műszerek és eszközök fertőtlenítése, megsemmisítése** (tűmegsemmisítő, égetés)
- D./ **Fertőző váladékok fertőtlenítése**

Feladat: Leoltás kézről, köröm alól véres táptalajra fertőtlenítő szerez kézmosás előtt és után

3. Konzerválás

4. Gyógyszerek mikrobiológiai ellenőrzése

Sterilitási vizsgálatok, **pirogenitási vizsgálatok** („Limulus Amebocyte Lysate”- LAL)

Feladat: Előző héten elvégzett levegő csíratartalom vizsgálata, kiértékelése (közös), eredmények leírása (telepek száma, morfológiája)

Antibiotikumok és antimikróbas kemoterápia

Feladat: Az előző heti kéz/köröm leoltások értékelése, kitenyészett baktériumok makroszkópos leírása

I. Antibiotikumok és kemoterápiás szerek mikrobiológiai vizsgálómódszerei

1. Baktériumok kemoterápiás szerek és antibiotikumok iránti érzékenységének vizsgálata
 - (A) Hígítási módszerek: **MIC-, MBC-meghatározás mikro- és makrodilúcióval**
 - (B) Diffúziós módszerek: lyukasztásos és papírkorong
 - (C) Hígítási-diffúziós módszer: **E-teszt**
2. Kemoterápiás szerek és antibiotikumok értékmérésének vizsgáló módszerei
 - (A) Diffúziós módszer: Szérum antibiotikum-szint meghatározás (monitorozás)
 - (B) Hígítási módszer: ismeretlen antibiotikum koncentrációjú oldat hígítási sora és ismert koncentrációjú hígítási sor összehasonlítása teszt baktériumon
3. Baktériumok antibiotikum-érzékenységének bemutatása korondiffúziós (Bauer-Kirby) módszerrel

Példák a természetes érzékenységre: penicillin korong *S. pyogenes*, **természetes rezisztenciára:** penicillin korong *E. coli*, vancomycin korong *Haemophilus influenzae* tenyészetén; a **keresztrezisztenciára:** penicillin, oxacillin, cephalosporin korong MSSA és MRSA tenyészetén, a **polirezisztenciára:** *P. aeruginosa*, *E. faecalis*
4. Kenet: L-forma natív készítményben

Feladat: Antibiotikum érzékenység meghatározása antibiotikum korongokkal és E-teszttel. (*S. aureus* MSSA és MRSA, *E. coli*, *Proteus sp.* *Pseudomonas* Müller-Hinton táptalajon)

Antibiotikum rezisztencia, szerológiai reakciók és tipizáló eljárások

Feladat: Előző heti leoltások értékelése antibiogram leolvasása, EUCAST határértékek bemutatása www.eucast.org Clinical breakpoint menüpontban excel táblázat alapján

Legfontosabb rezisztens kórokozók

MRSA, MRSE, ESBL: *Klebsiella*, *E. coli*, MBL: *Pseudomonas*

Fluorokinolon rezisztencia: *Klebsiella*

vancomycin rezisztencia: *Enterococcus*, *Staphylococcus*

Szerológiai reakciók és tipizáló eljárások**II. Szerológiai reakciók****1. Agglutinációk**

(A) **Tárgylemez agglutináció** /kvalitatív/ (*E. coli*), [gyakorlása \(polyvalens savó\)](#)

(B) **Csősorozat (Widal típusú) agglutináció** /kvantitatív

2. Precipitáció

(A) Folyékony közegben: **korong** (bemutatás), kvantitatív (dia), flokkuláció (dia).

(B) Agar-gélben (**immundiffúziós módszerek**): kétdimenziós, immunelektroforézis (dia)

3. Immunfluoreszcens módszerek: direkt- és indirekt-IF**4. ELISA**

5. Immuncitolitikus reakciók: bacteriolysis, haemolysis, valamint komplement titrálás, komplementkötési reakció (**KKR**) Takátsy-lemezen,

6. Western blott technikák

7. Immunkromatográfia (*C. difficile*, *Legionella*)

8. A szerológiai reakciók eredményének értékelése (antitest termelés dinamikája, **savópár jelentősége**)

9. Tipizáló eljárások: fágtypizálás; szerotipizálás, PFGE; szekvencia tipizáló eljárások – MLST, MALDI-TOF

Gram-pozitív coccusok I: *Staphylococcus*

1. *Micrococcus* sp. és *Staphylococcus* sp. törzsek elkülönítése:
(b) OF-teszt: *Micrococcus* (O+F–), *Staphylococcus* (O+F+)
2. Mintatenyészetek:
***S. aureus*, *S. epidermidis* *S. saprophyticus*: agar és véresagar táptalajon, *S. aureus* dextrózos bouillonban**
3. A staphylococcusok jellemző biokémiai reakciói
 - (a) **Kataláz-reakció**
 - (b) Koaguláz tesztek: cső-, **tárgylemez (clump)**, kereskedelmi kittek. A **clump teszt elvégzése** kereskedelmi kittel *S. aureus* (+) és *S. epidermidis* (–) mintából
 - (d) A *S. saprophyticus* (R) és *S. epidermidis* (É) novobiocin R/É bemutatása
4. Antibiotikum érzékenység bemutatása:
 - (a) *S. aureus*: MSSA és MRSA-törzsek bemutatása cefoxitin koronggal, *mecA*-gén PCR-módszerrel (gélfényképek)
 - (b) Koaguláz negatív MS és MR staphylococcus törzsek: a keresztérzékenység és a kereszt-rezisztencia demonstrálásával
5. **Fágtipizálás** elve és egy készítmény bemutatása
6. Mintakenetek: ***Staphylococcus* sp. és *Micrococcus* sp. Gram-szerint,**

Feladat: előző heti leoltások értékelése

Gram-pozitív coccusok II:

1. ***Streptococcus pyogenes* és *S. agalactiae***
 - (a) Mintatenyészetek: **véres** táptalajon
S. pyogenes bouillonban
 - (b) **Lancefield tipizálás**
 - (c) **CAMP-teszt**: *S. agalactiae* (+). *S. pyogenes* (–)
2. ***S. pneumoniae* és *S. mitis***
 - (a) Mintatenyészetek: **véresagar** táptalajokon
 - (b) **optochin érzékenység** vizsgálata: ***S. pneumoniae* (É) és *S. mitis* (R)**
 - (c) Epeoldás vizsgálata (Na-dezoxikolát): *S. pneumoniae* (+) és *S. mitis* (–)
 - (d) A *S. pneumoniae* szerológiai azonosítása tárgylemez agglutinációval (Slidex Pneumo kitt doboza és fólia)
 - (e) **Oltóanyagok** (Pneumovax, Prevenar 13)
3. ***Enterococcus faecalis***
 - (a) Mintatenyészetek: véres agar táptalajon
 - (b) Az *E. faecalis* növekedése 6.5 % NaCl-ot tartalmazó táptalajon 45 °C
 - (c) Az ***E. faecalis* Uricult Plus** táptalajon
5. **AST, CRP** (a kittek dobozai és fóliák)
6. Antibiotikum érzékenység bemutatása
 - (a) *S. pyogenes* (kiemelni: penicillin érzékenység, makrolid rezisztencia)
 - (b) *E. faecalis* (kiemelni: cefalosporin rezisztencia, vancomycin érzékenység, ampicillin és aminoglikozid, vancomycin és aminoglikozid szinergizmus)
7. Mintakenetek: ***S. pyogenes*, *S. pneumoniae* Gram-szerint festve**

Szerdai csoportoknak az előző heti tananyag is!**Szabálytalan nem spóráképző Gram-pozitív pálca:***Corynebacterium*

- (A) ***Corynebacterium diphtheriae*** Löffler és Clauberg táptalajon
- (B) Virulenciapróba (**Elek-próba**) a toxint termelő és nem termelő *C. diphtheriae* törzsek elkülönítésére (dia), Römer próba (dia)
- (E) **Oltóanyagok** (DPT, DT, ill. antitoxinok)

Mintakenetek: ***C. diphtheriae*** Neisser-szerint festve fixált keneten

Szabályos nem spóráképző Gram pozitív pálcák:

- (A) *Lactobacillus*
 - (a) Mintatenyészet: Rogosa-agar
 - (b) készítmény: pro és prebiotikumok, Bonolact
 - (c) Mintakenet: *Lactobacillus sp.*
- (B) *Listeria monocytogenes* agar és véresagar táptalajon
- (C) *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Feladat: Neisser-festés lépései és elvégzése fixált kenettel

Feladat: Saját orr/torok leoltása véres, csokoládé és clauberg agarra**Gram-negatív coccusok**

(A) *Neisseria* genus és *Moraxella*

- (a) *N. meningitidis*, „*N. pharyngitidis*” tenyészetek (agar, véres agar, csokoládé és speciális táptalajokon)
- (b) **Oxidáz próba** bemutatása és elvégzése agar táptalajon apatogén *Neisseria sp*-vel
- (c) A Gonoline mintavételi és tenyésztési rendszer bemutatása (a kitt doboza és fólia)
- (d) Mintakenetek: *Neisseria sp.* (színtenyészetből) **Gram-szerint** festve, **gonorrhoeás váladék metilénkéssel** festve
- (f) Wellcogen video (meningitis ag kimutatási gyorseszteszt)

Gram negatív coccobacillusok

(A) *Haemophilus* genus

- (a) Mintatenyészet: *H. influenzae* csokoládéagaron
- (b) **Dajkajelenség véresagar táptalajon: *H. influenzae***
- (c) ***H. influenzae* (XV+) és *H. parainfluenzae* (XV+, V+) X- és V- faktorkorongokkal** (Sims) agar táptalajon
- (d) **Vancomycin rezisztencia** bemutatása, ampicillin, amp+klav érzékeny és rezisztens ***H. influenzae*** törzsek bemutatása (korongdiffúzió)
- (e) **Oltóanyagok** (pl. Act-HIB, Hiberix, PedvaxHIB doboza és leírása)
- (f) Mintakenet: *Haemophilus sp.* **Gram-szerint** festve

(B) *Bordetella* genus

- (b) Steril Bordet-Gengou táptalaj *Bordetella spp.* tenyésztésére

(C) *Brucella* genus

- (a) **Wright reakció** bemutatása.

(D) *Francisella* genus és *Y. pestis*

Gram negatív pleomorf pálca

Acinetobacter genus

Acinetobacter mintatenyészet

Gram-negatív aerob pálcák

(A) *Pseudomonas* genus

Mintatenyészet: *P. aeruginosa* agar- és véresagar táptalajon,

- (a) **oxidáz reakció** elvégzése **tárgylemezen**
- (b) Pigment extrakció kloroformmal
- (c) *P. aeruginosa* OF-táptalajon (oxidatív glükózbontás)
- (d) Antibiotikum érzékenység vizsgálata: valamint polirezisztens *P. aeruginosa*

(B) *Legionella* genus

- (a) Steril BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) agar és *Legionella pneumophila* mintatenyészet, BinaxNow teszt

OLTÓANYAGOK (kötelező: DPT, HiB; lehetőség: tularémia, brucellosis, Meningococcus), **oltási naptár**

Az előző heti leoltások értékelése**Gram-negatív fakultatív anaerob pálcák****1./ *Enterobacteriaceae*****(A) *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*****(a) *E. coli* agar és EM táptalajon****(b) A *Proteus* rajzása agar, és EM (rajzástáplálóval és a nélkül) táptalajon****(c) *Klebsiella sp.* agar és EM táptalajon****(d) *S. marcescens* agar táptalajon (vörös pigment!)****(B) *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*****(a) *S. typhi* és *E. coli* brillantzöld és *S. typhi* bizmut-szulfid táptalajon****(b) *Salmonellák*, *Shigellák* biokémiai reakciói (biokémiai sorok, módosított Russel-táptalaj)****(c) Gruber-Widal reakció****(d) Oltóanyag: monovalens typhus vaccina****(e) *Shigella sp.* és *E. coli* EM és DC táptalajon****(f) *Y. enterocolitica* DC táptalajon****(g) Váladékvételi tartályok (széklet tartály)****(C) Biokémiai tesztek és differenciáló/szelektív táptalajok bemutatása****(a) Ureum-bontás (Christensen-, U-I táptalaj, + *Klebsiella sp.*)****(b) Indol-képzés (U-I táptalaj, + *E. coli*)****(c) H₂S képzés (H₂S-magas agar, bizmut-szulfid táptalaj, + *Proteus*, *Salmonella*)****(d) Cukorbontás és gázképzés (TSI-táptalaj)****(D) Mintakenetek: *E. coli* Gram-szerint festve, L-forma, tok kimutatása (tus készítmény *Klebsiella sp.*)****2./ *Vibrionaceae*****TCBS táptalaj****(a) A kolera elleni védőoltás kritikája****Feladat: Tárgylemez agglutináció (*E. coli*), gyakorlása, szerotipizálás (polyvalens + specifikus savó/k/)**

Gram-pozitív spórások baktériumok

- A. Gram-pozitív aerob spórás baktériumok: *Bacillus* genus
 - (a) ***Bacillus cereus* agar, véres agar és tojás táptalajon** (lecitináz +)
 - (b) Mintakenetek: ***Bacillus sp.* Gram-szerint** festve
- B. Gram-pozitív anaerob spórás baktériumok: *Clostridium* genus
 - (a) ***C. tetani* és gázgangréna clostridiumok Holman és tioglikolát táptalajon**
 - (b) *C. perfringens* szelektív anaerob véresagaron (SAVA)
 - (c) **Oltóanyagok, antitoxinok** (TANAT, TETIG 500, Gázödéma elleni savók, Antibotulique serum)
 - (d) Mintakenetek: ***C. tetani* és gázgangréna clostridiumok** Gram-szerint
 - (e) *C. difficile*: CCFA agaron és gyorsteszt

Microaerofil baktériumok

- (A) A mikroaerofil tenyésztés paramétereit és módszereit (anaerob jar a különböző gázfejlesztő tasakkal)
- (B) *Campylobacter*, *Helicobacter*
 - (b) Mintatenyészetek: *Campylobacter sp.* és *Helicobacter pylori* tenyészet bemutatása
 - (b) Gyorsdiagnosztikai módszerek bemutatása
 - (c) Radioaktív urea kilégzési teszt (fólia)

Obligát anaerob baktériumok

Bacterioides-csoport, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium és Peptostreptococcusok (F. negoldia magna)

- A. Anaerob tenyésztés módszerei: **anaerostat, vials (thioglikolát, Holman) lezárás, kémiai módszerek**
- B. Nem spórás obligát anaerob baktériumok
 - (a) Identifikálás zsírsav spektrum alapján, MALDI-TOF
 - (b) Anaerob baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata agarhígításos, illetve E-teszt módszerrel
- C. Mintakenet: Plaut-Vincent angina

Videofilm: **Anaerob fertőzések**

Saválló Gram-pozitív pálcák1. *Mycobacterium* genus

- (a) *M. tuberculosis* Löwenstein, Sula táptalajokon
- (b) Apatogén és atypusos mycobacteriumok Löwenstein táptalajon
- (c) A **PCR-technika és gyorsesztek használata a tbc diagnosztikájában** (fólia)

Mintakenet: direkt **Koch-pozitív köpet Ziehl-Neelsen-szerint** festve

Oltóanyagok (BCG), oltási naptár

Tuberculin reakció elve, értékelése, kritikája (dia)

Váladékvételi tartályok

2. *Nocardia* genus – lezárt petricsészében3. *Actinomyces* - lezárt petricsészében, mintatenyészet véres agar táptalajon4. *Streptomyces* sp.

Mintatenyészet: *Streptomyces* sp. agar táptalajon

Feladat: Ziehl-Neelsen festés elvégzése fixált keneten

Spirochaeták1. *Treponema* genus

(a) Lues szerológia: CL, RP), **VDRL, RPR** bemutatása és fólia a specifikus reakciókról: **FTA, TPHA, TIT** (Nelson)

(b) Lues molekuláris diagnosztikája (PCR, sy-immunkromatográfia)

(c) Mintakenet: Plaut-Vincent angina

2. *Leptospira* genus

(a) fixált leptospira kenet **ezüst-impregnációval**

(b) **Steril Korthof** táptalaj és **Leptospira** tenyészet **Korthof**-táptalajon

3. *Borrelia* genus

(a) Kullancs, **kullancscsipesz**, a **kullancs eltávolításának szabályai**

(b) ELISA és PCR

Gyakorlati vizsga: mintakenetek felismerése mikroszkóp segítségével

1. Rickettsiák

Rickettsia prowazekii

(a) ruhatetű diaposzítíven

(b) tenyésztési lehetőségek (embrionált tojás, szövetkultúra)

(c) **Weil-Félix** reakció

2. Chlamydiák

(a) **Mintavételi eszközök és technikák** (fóliák is)

(b) Tenyésztés (steril McKoy-sejtkultúra)

(c) Ellenanyag kimutatás: IF-képek, ELISA

3. Mycoplasmák

(a) Tenyésztés: steril és leoltott folyékony Mycoplasma táptalajok (BEA, BEG, diaposzítív

Mycoplasma sp. telepmorfológiáról szilárd táptalajon

Ellenanyag kimutatás: ELISA, IF

Mikroszkópos gyakorlati vizsga?!

Budapest, 2019.09.01.

Dr. Szabó Dóra

intézetigazgató