

Orális diagnosztikai alapismeretek előadás

Laboratóriumi diagnosztika a fogászatban
Mikrobiológiai, klinikai kémiai és genetikai diagnosztika

Dr. Vályi Péter
egyetemi docens

SE FOK Orális Diagnosztikai Tanszék



SEMMELWEIS
EGYETEM 1769

Laboratóriumi vizsgálatok

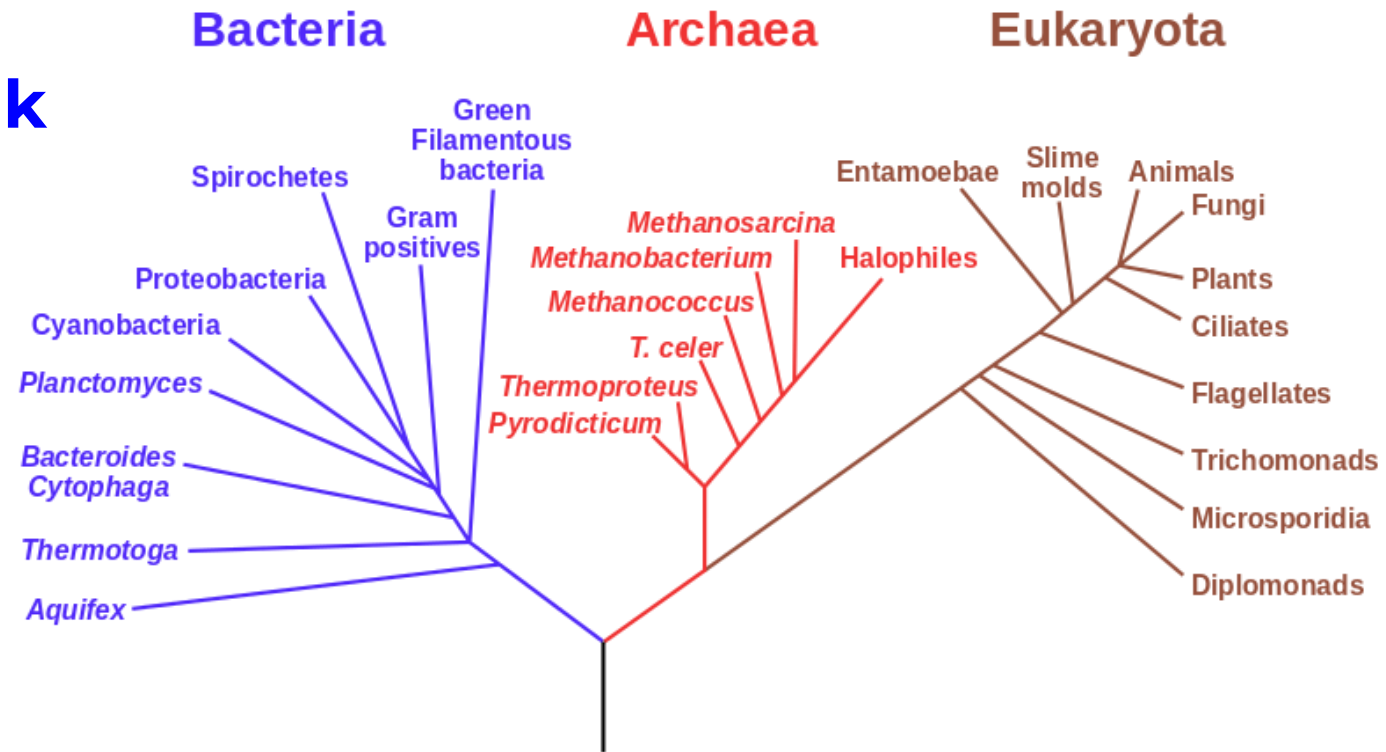
- Akkreditált laboratóriumi vizsgálatok
 - Mikrobiológiai
 - Klinikai kémiai vizsgálatok
 - Genetikai vizsgálatok
- „Chair-side tesztek”
 - Mikrobiológiai
 - Biokémiai
 - Genetikai tesztek

Mikrobiológiai vizsgálatok

Mikroorganizmusok - mikróbák

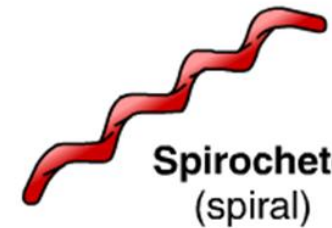
Phylogenetic Tree of Life

a baktériumok és az archeák („ősbaktériumok”) nem rendelkeznek sejtmaggal (prokariota szervezetek)



Mikroorganizmusok - mikróbák

- **baktériumok: gömb (coccus), pálcika (bacillus), vagy spirális alak (spirochaeta)**



Mikroorganizmusok - mikróbák

- protozoonok (véglények, protozoák),
- gombák

eukariota sejtek, rendelkeznek sejtmaggal

Embereket fertőző protozoonok



Giardia intestinalis



Trichomonas vaginalis



Trypanosoma gambiense



Leishmania sp.

Candida albicans

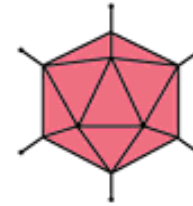
Az **egysejtű**, élesztőgombaszerű forma invázió, **fonalképző** formává alakulva okoz betegséget emberben (pl. szájüregi candidiasis)



Mikroorganizmusok - mikróbák



Poliovirus

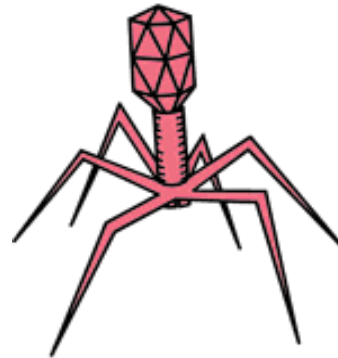


Adenovirus



Herpesvirus

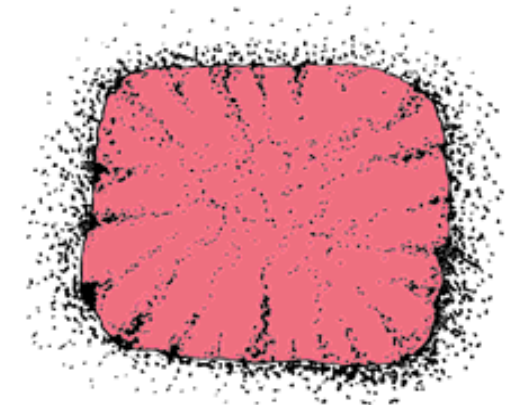
- vírusok:
csak egysejtű vagy
többsejtű
szervezetekben tudnak
szaporodni



Bacteriophage



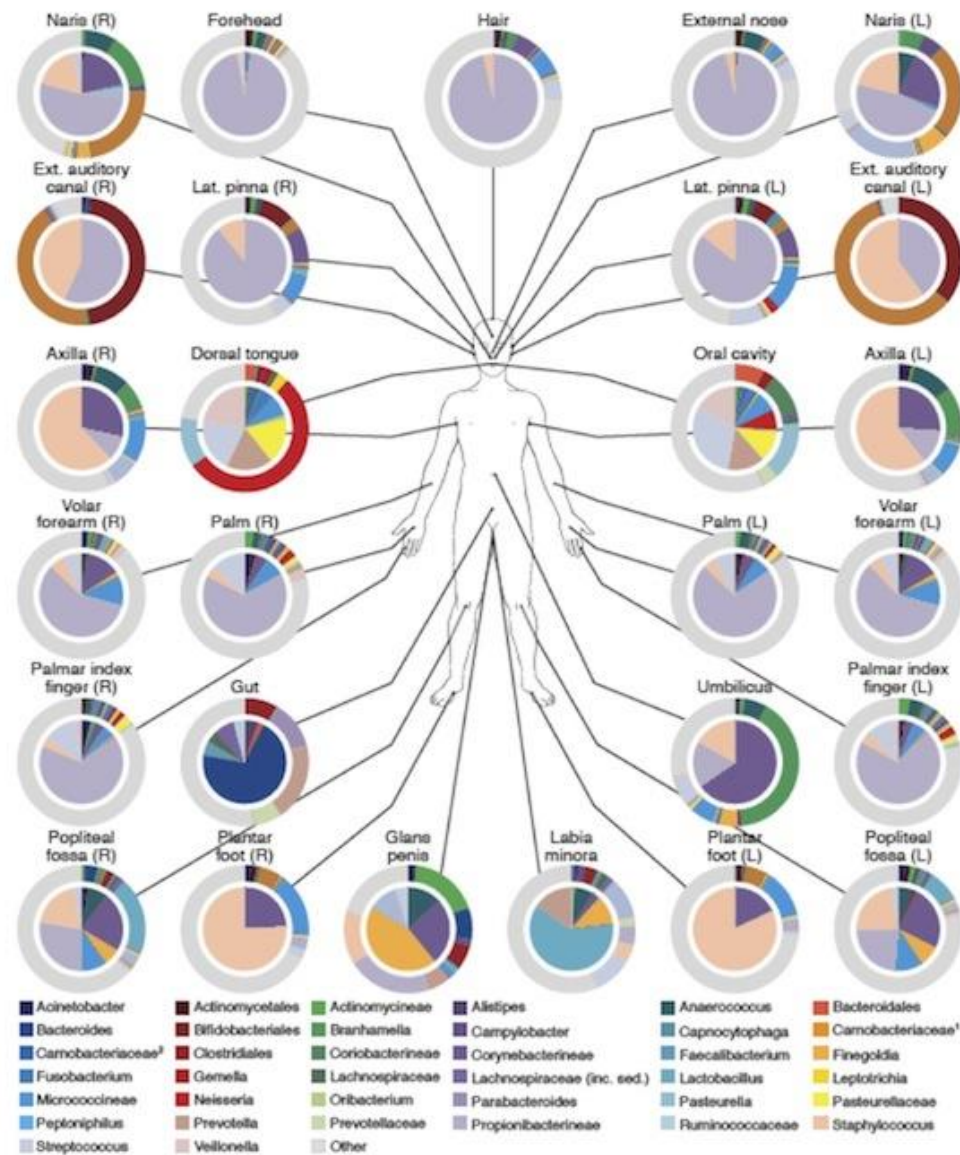
Mumps virus



Vaccinia virus

Természetes flóra

- A Humán Mikrobioma Projekt feltérképezte a különböző emberi testtájak mikroba közösségeit



A száj mikroflórája

- **Normál flóra:** a testfelszínen és a testüregekben állandóan (rezidens flóra) vagy átmenetileg (tranziens flóra) jelen lévő, és az adott helyen az egészséges szervezetben betegséget nem okozó baktériumok összessége
- A száj mikroflórája (orális mikrobioma) igen változatos összetételű, komplex mikrobiális közösség
- A 16S rRNS (riboszomális RNS) molekulát kódoló gének vizsgálata alapján 700 baktériumfaj volt kimutatható a szájüregben, közülük 350 tenyészthető a klasszikus bakteriológiai módszerekkel

(Aas J.A., és mtsai, 2005, J Clin Microbiol 43, 5721-5732)

A mikroorganizmusok a szájüregben

- Depozitumok a természetes és kemény felszíneken
 - akvirált pellikula
 - dentogingivális plakk
 - fogkő
 - debris
 - materia alba
- Invázió az ökológiai résekbe – lágyrészek illetve a kemény fogfelszín réseibe
- Betegséget okoznak – lokálisan és szisztémásan
 - Fogágybetegségek
 - Caies és következményes megbetegedések (fogbél megbetegedései)
 - Infekciók és immunológiai eltérések a szájnyálkahártyán

Biofilm képződés

- Baktériumközösség, amely természetes vagy mesterséges felszínen tapad, nedves környezetben, amely elegendő tápanyagot tartalmaz

3° colonizers (Gram-)
Porphyromonas gingivalis

2° colonizers (Gram-)
Bridge species - *F. nucleatum*
Bind other bacteria

1° colonizers (Gram+)
Streptococci bind pellicle proteins from saliva
DENT 5302

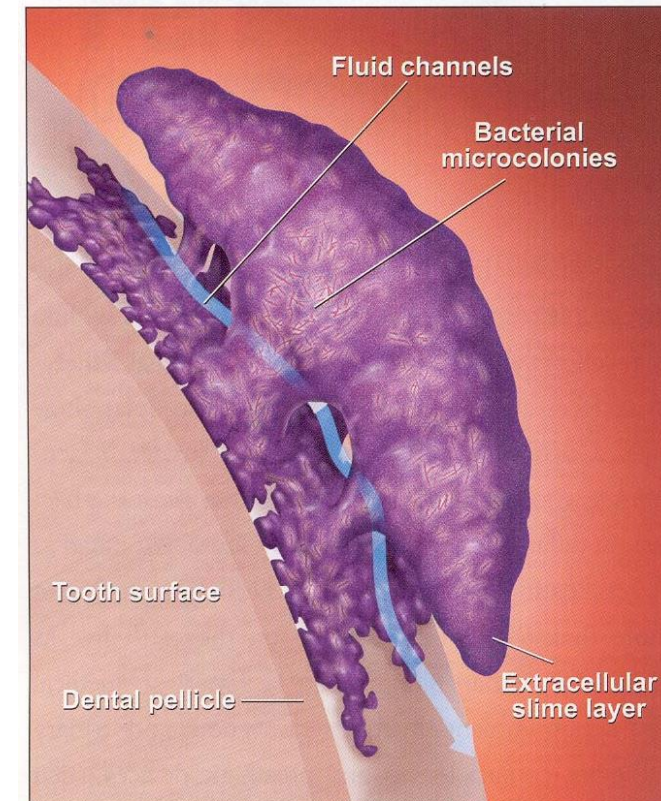
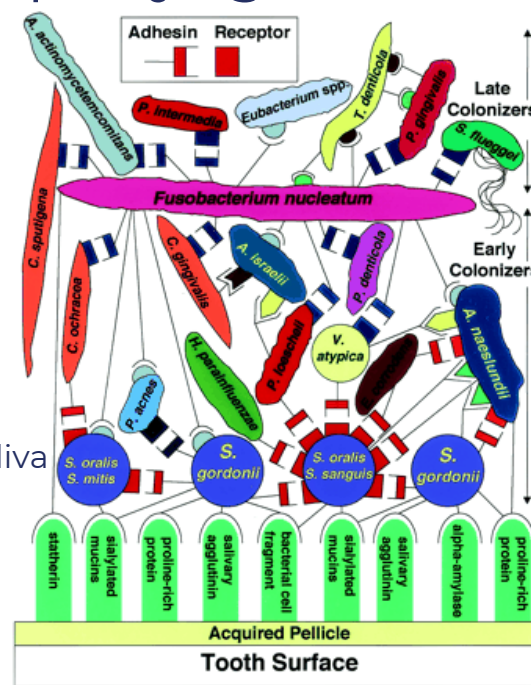
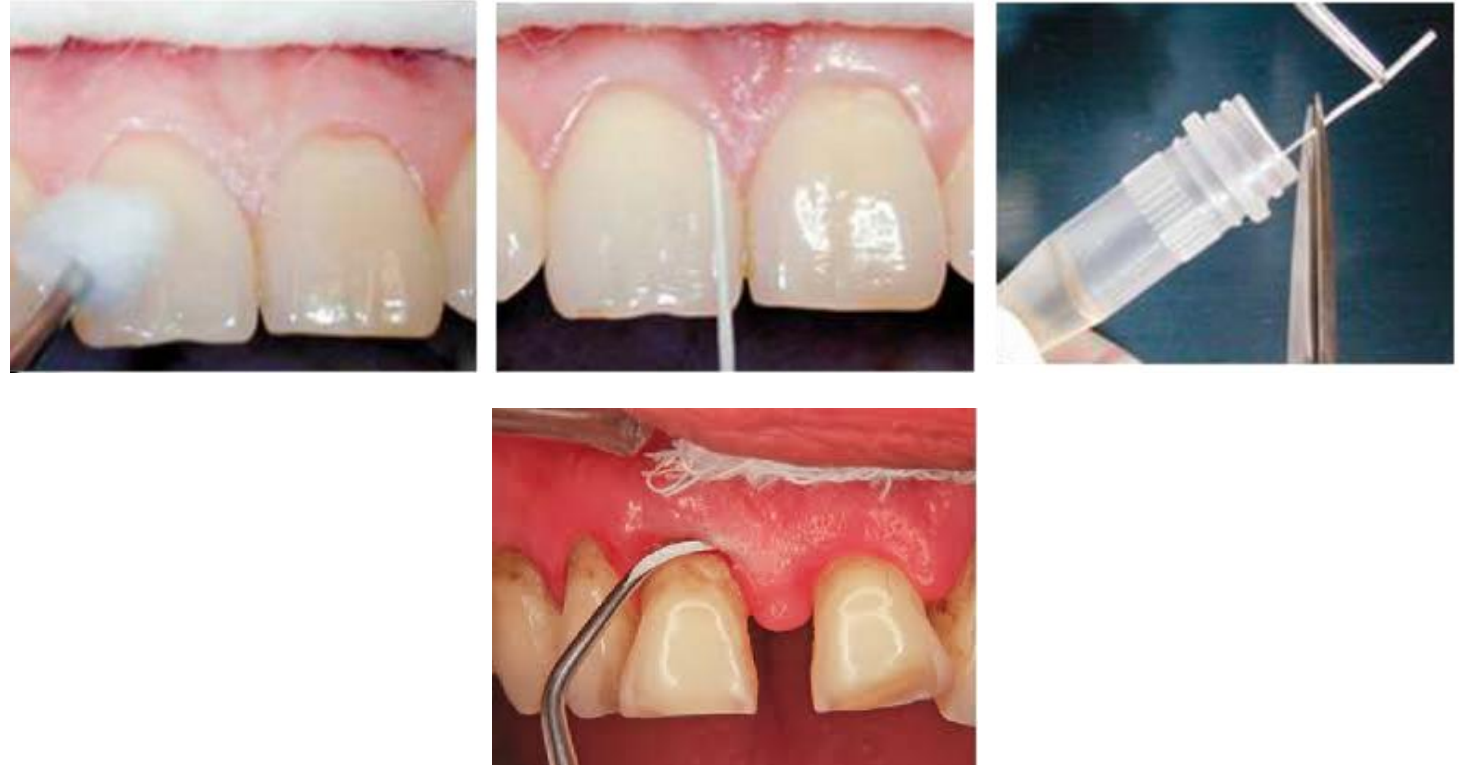


Figure 2. Dental Plaque Biofilm. Conceptual illustration of the biofilm structure.

Mikrobiológiai diagnosztika

Mikrobiológiai vizsgálat menete

- Mintavétel



- *papírhoén*
- *kürettkanál*

Mikrobiológiai vizsgálat menete

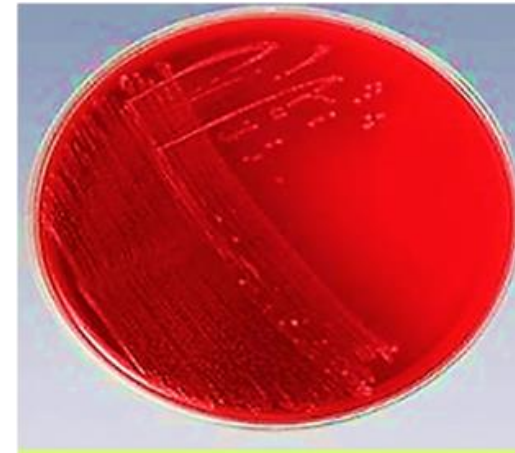
- Diagnosztikai kérőlap
- Mintavétel
- Transzport
- Eredmények interpretáció



Paper Point



**Anaerobic Transfer
Medium**



**Lab Agar for Culture &
Sensitivity Testing**

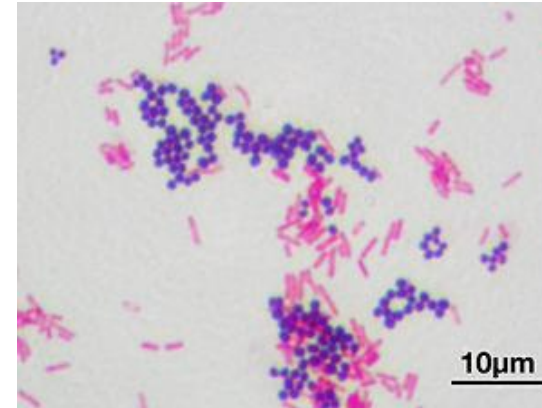
- *Transzport közeg*
- *Mintavételi cső*

Baktériumok kimutatásának eszközei

- Mikroszkópos technikák
- Tenyésztéses módszerek és biokémiai reakciók, antibiotikum érzékenység vizsgálata
- Antigén és antitest kimutatási módszerek
- Molekuláris biológiai módszerek
 - Nukleinsav kimutatási módszerek
 - Proteomikai módszerek

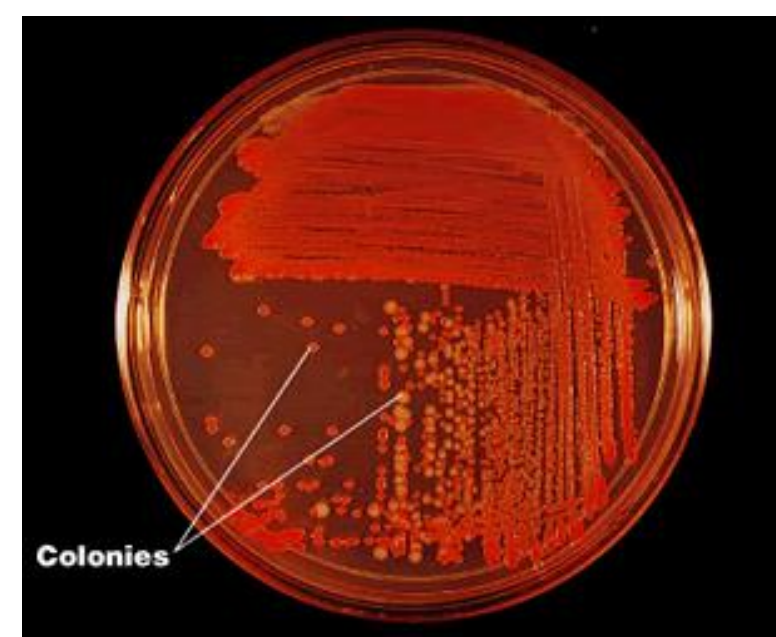
Mikroszkópos technikák

- Fénymikroszkóp
- Elektronmikroszkóp
 - Bakteriális fertőzésre nem
- Gram-festés
 - Gram pozitív (ibolya színű) coccusok és Gram negatív (pirosas színű) pálcák

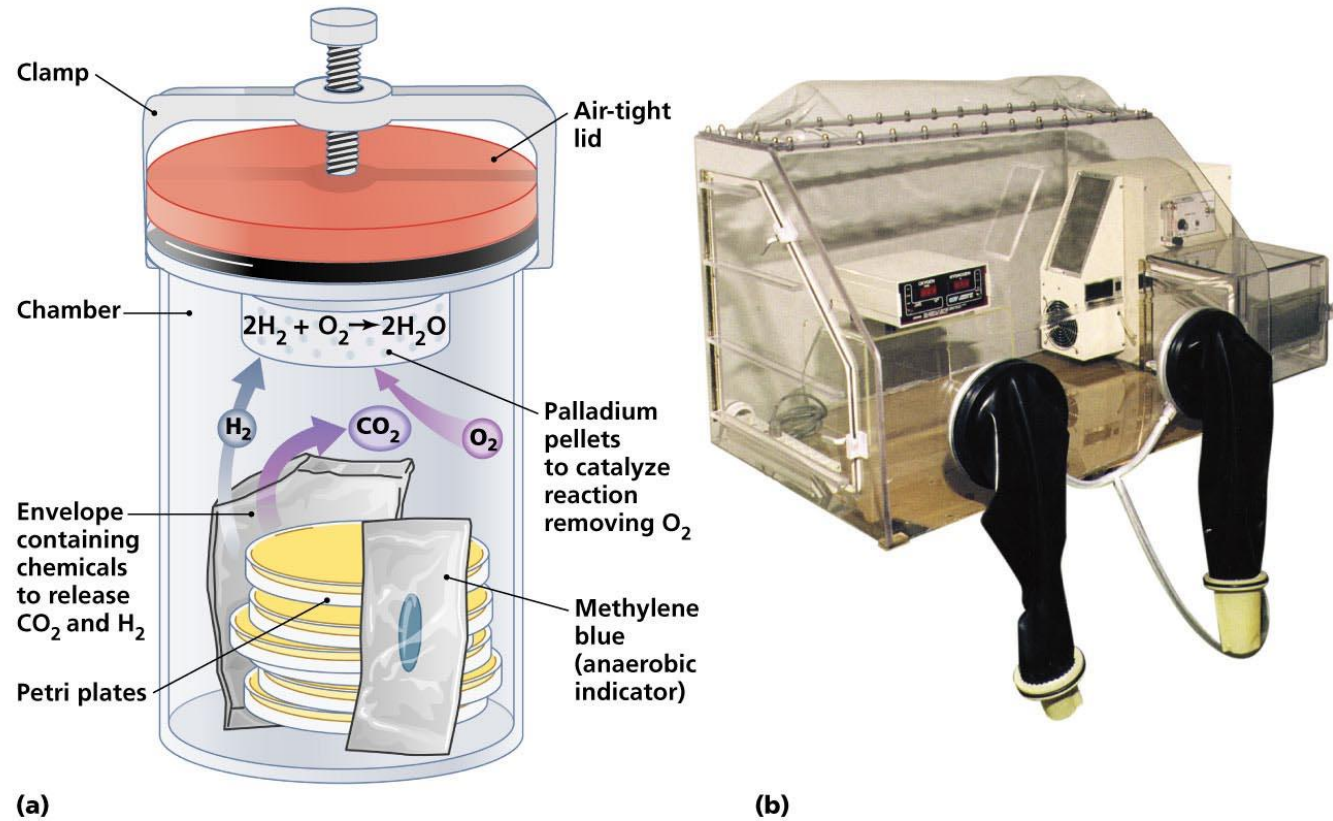


Tenyésztés

- Szilárd táptalaj: A bakteriológiai vizsgálatok során a vizsgálandó anyagokból egy keveset szilárd táptalajok felületére kenünk **(szélesztés)** A beoltott táptalajokat megfelelő viszonyok közé helyezve (inkubálva) azok felületén a baktériumok **telepeket (kolóniákat)** képeznek



Anaerob baktériumok tenyésztése: anaerob inkubátor és anaerob munkahely



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

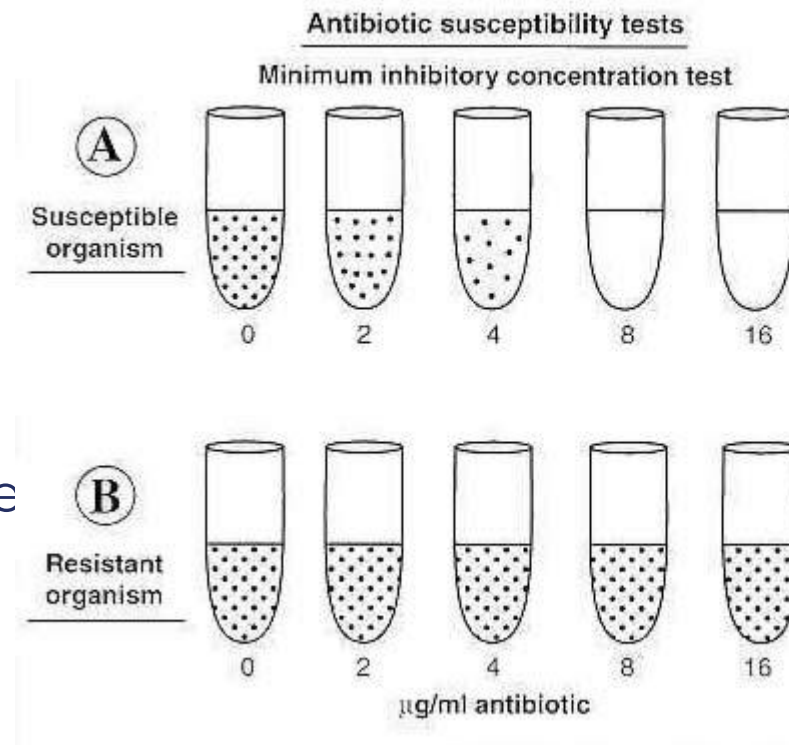
Biokémiai reakciók

- A biokémiai tesztek elvégzésekor általában speciális táptalajokat használnak, melyek tartalmazzák az elbontandó szubsztrátumot
 - Epeoldékonyság
 - Kataláz teszt
 - Citrát hasznosítás
 - Koaguláz teszt
 - DNáz teszt
 - Indol teszt
 - Lizin dekarboxiláz teszt
 - Oxidáz teszt
 - Ureáz teszt

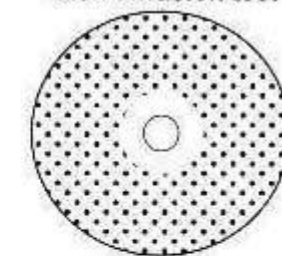
Az antibiotikum érzékenység főbb vizsgáló módszerei



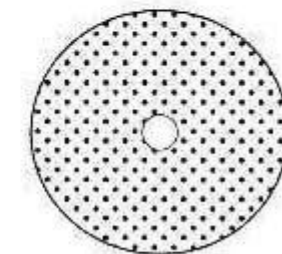
- Korong diffúzió
 - A baktériumtenyésztetre különböző antibiotikumokat tartalmazó korongokat helyeznek; a **gátlási zóna** az antibiotikum-érzékenység jele
- MIC teszt
 - Antibiotikum koncentráció-sorozat alkalmazása



Disk diffusion test



**ÉRZÉKENY
BAKTÉRIUM**



**REZISZTENS
BAKTÉRIUM**

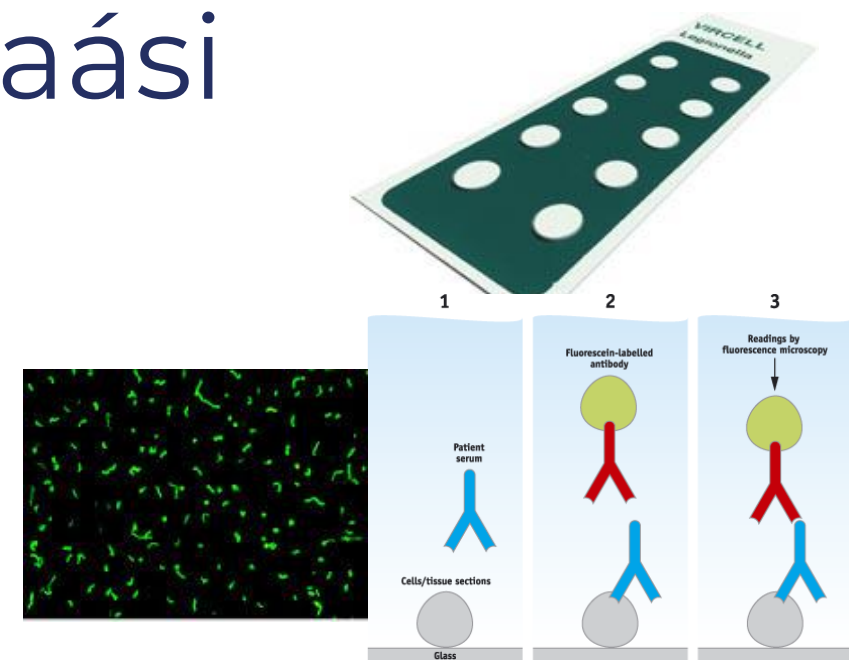
10 µg antibiotic in discs

MIC teszt

Korong diffúziós teszt

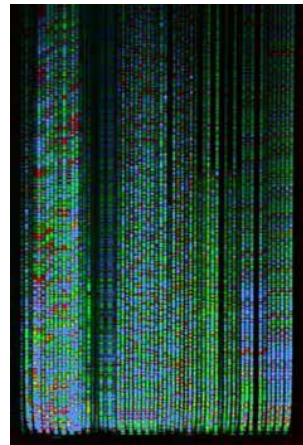
Antigén és antitest kimutató módszerek

- Immunfluoreszcencia
 - Antitest kimutatás - A tárgylemezen rögzített, ismert baktériumot a beteg szérumával reagáltatják majd fluoreszcen-jelölt anti-humán antitesttel inkubálják és fluoreszcens mikroszkópban analizálják
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
 - A lemez mélyedéseiben antigéneket rögzítenek, ezek megkötik az ellenük irányuló antitesteket, amelyek egy második, enzimmel jelölt antitesttel detektálhatók (indirekt módszer)



Molekuláris biológiai módszerek

- Nukleinsav kimutatási módszerek
 - Bakteriális DNS kimutatása **polimeráz láncreakcióval (PCR)** –
 - Valamely DNS szakasz felszaporítása ismert szekvenciájú oligonukleotidok (primerek) és Taq DNS polimeráz felhasználásával
 - Alkalmas adott baktérium jelenlétének kimutatására klinikai vagy környezeti mintákban
 - Baktériumok azonosítása DNS szekvenálással
 - Valamely DNS molekula nukleotid sorrendjének meghatározása
 - A DNS szekvenciát a futtatás alapján a fluoreszcenciát detektáló számítógépes rendszer határozza meg, mely leméri minden egyes „csík” fénykibocsátásának intenzitását. A különböző színű „csúcsok” (A C G T) sorrendjéből a szekvencia kikövetkeztethető.
- Proteomikai módszerek



MALDI-TOF

- Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry
- Mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáción és az ionok repülési idejének analízisén alapuló tömegspektrometriai módszer



Klinikai laboratóriumi vizsgálatok

- Vérből
 - Vérkép
 - Vércukor
 - Ionok
 - Máj- s vesefunkció
 - Véralvadás
- Vizelet rutin, üledék
- Tumormarkerek
- Endokrin panel
- Egyéb

Genetikai vizsgálatok

- Monogénes öröklődés
- Poligénes öröklődés

- Cél:
 - genom rendellenességeihez vezető eltérések, a kialakuló kórfolyamatok felismerése,
 - a veszélyeztetett egyének és családok korai identifikálása,
 - a genetikai ártalom pontos diagnosztizálása nyomán a családon belüli ismétlődés megelőzése
 - a genetikai hibával születettek testi, szellemi károsodásának megelőzése, az érintettek rehabilitálása

„Chair-side” tesztek

„Chair-side” tesztek - mikrobiológiai

Név	Típus	Mit	Visualizáció
Evalusite	EIA	Aa, Pg, Pi	színelváltozás
Perioscan	Enzimaktivitás - BANA	Tf, Pg, Td, Capnocytophaga	színelváltozás
Omnigene	DNS teszt - hibridizáció	Aa, Pg, Pi	Radioizotópos jelölés
IAI Pado Test	RNS teszt	Aa, Pg, Tf, Td	
MyPerioPath	DNS teszt - PCR		Laboratóriumi jelentés
Micro-IDent	DNS teszt - hibridizáció	Aa, Pg, Pi, Tf, Td	Laboratóriumi jelentés
Micro-Ident Plus	DNS teszt - hibridizáció	Előző+Pm, Fn, Cr, En, Ec, Csp	Laboratóriumi jelentés

„Chair-side” tesztek - biokémiai

- Nyálból
- Sulcusfolyadék
- Kollagenáz,
- Elasztáz – PMN lizoszómákból szabadul fel
- MMP-típusok
- IL-1, IL-8
- Szulfid felszabadulás – bizonyos baktériumok Tf, Pg, Pi illetve szérumfehérjék bomlása
- Baktérium toxinok, bakteriális fehérje
- CRP
- Aszpartát-aminotranszferáz enzim – sejtek pusztulása

„Chair-side” tesztek - genetikai

- IL-1 polimorfizmus

Köszönöm a figyelmet

Dr. Vályi Péter



SEMMELWEIS
EGYETEM 1769