

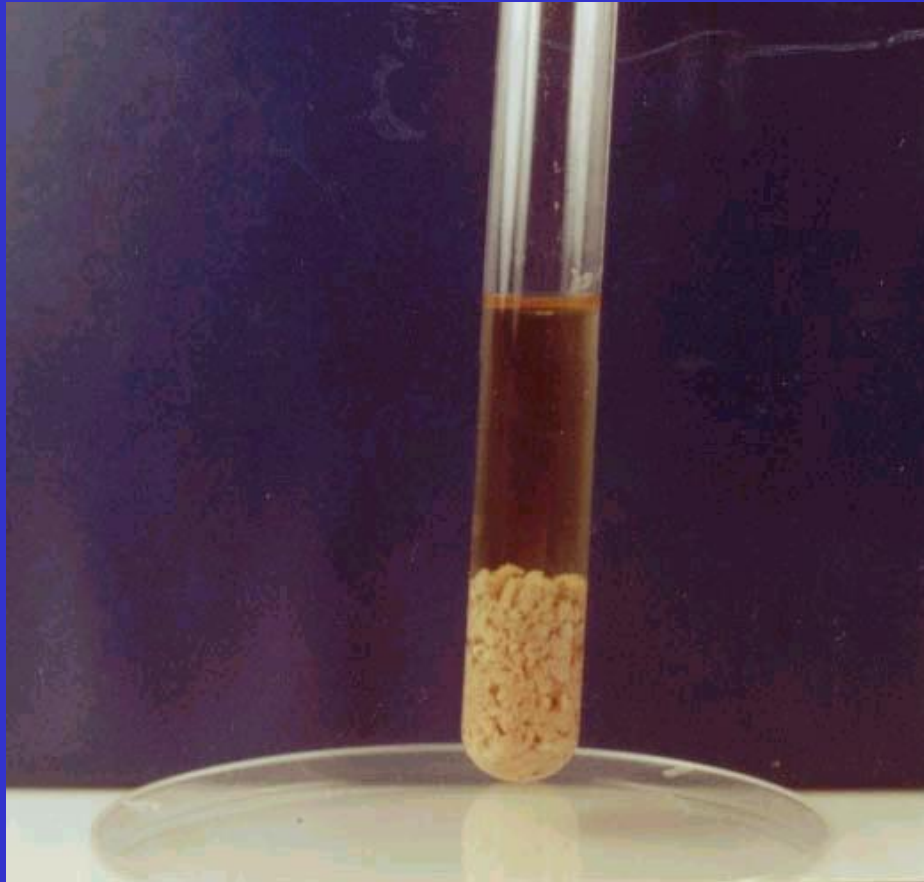
Gyakorlati vizsga

I. Steril táptalajok

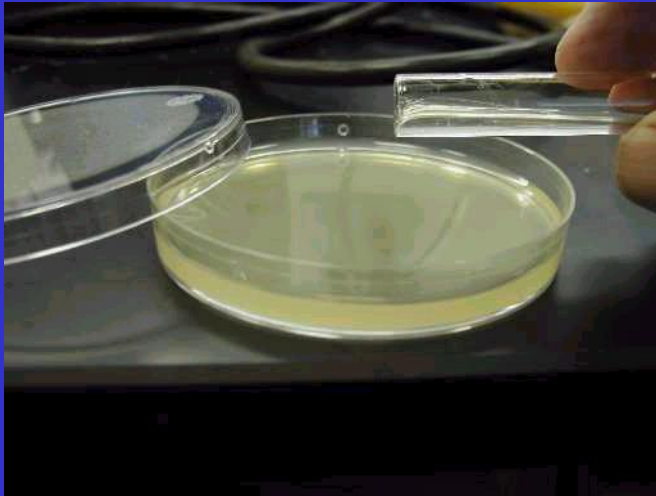
1. Bouillon, 2. Ferde agar, magas agar



4. Dúsító táptalajok: húsos bouillon



3., 5., 6.: Lemez agar, véres agar és csokoládé agar



Uninoculated chocolate agar plate

7. Szelektív és differenciáló táptalajok

c. Eozin metilénkék (EMK)



Laktóz + telepek



Laktóz - telepek

8. Hemokultúra palackok



9. Vírus transzport táptalaj

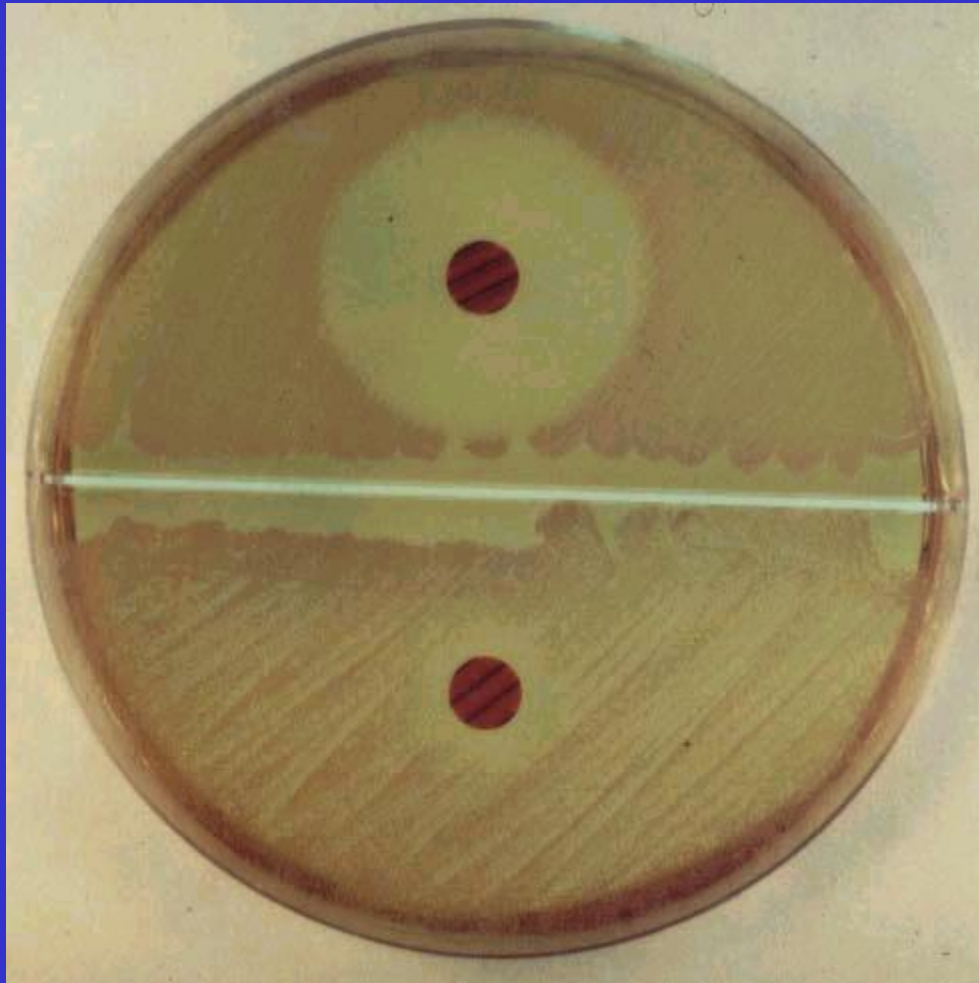


II. Tenyészetek

1-2-3. *Staphylococcus aureus* és *S. epidermidis* agaron és véres agaron



4. *S. epidermidis* (É) és *S. saprophyticus* (R) novobiocin koronggal



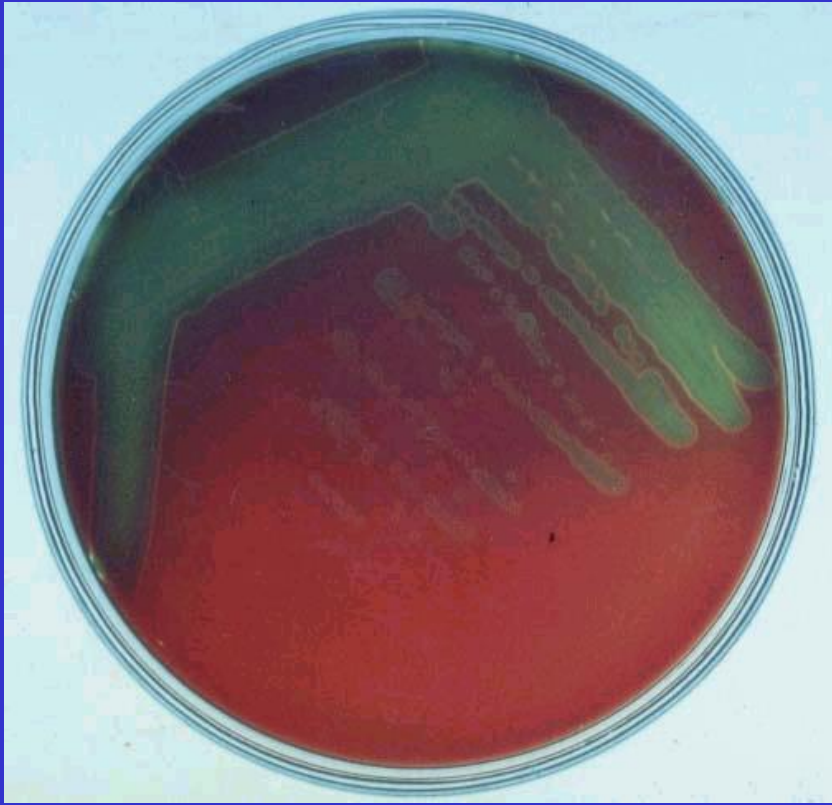
5. *Streptococcus pyogenes* véres agaron



Tűszúrásnyi telepek,
erős béta-hemolízis!



6. *Str. mitis* véres és csokoládé agaron



7. *Streptococcus pneumoniae* véres agaron (optochin É)



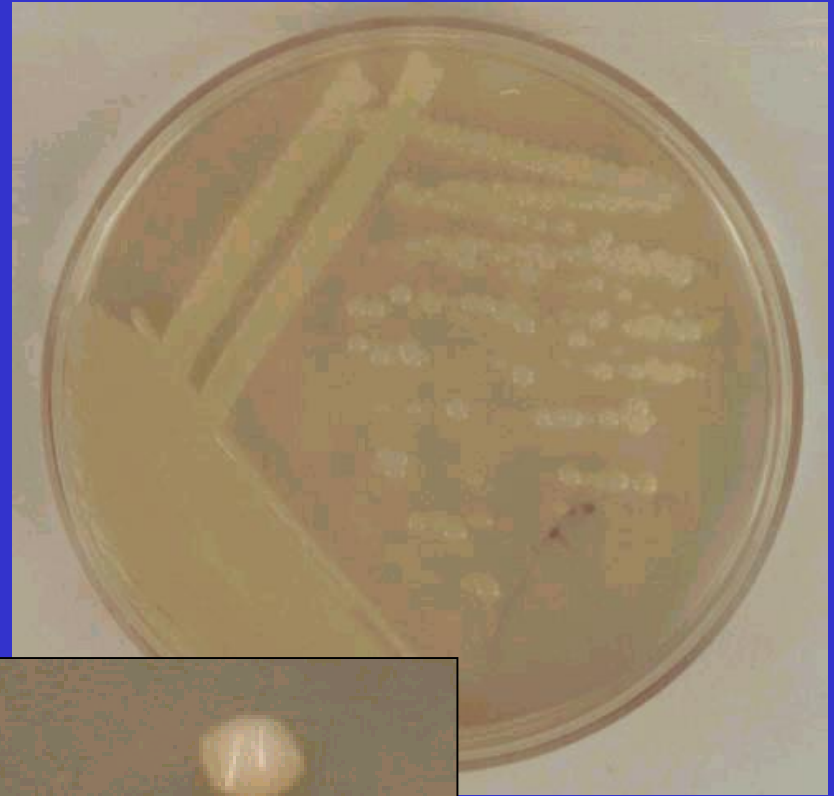
8. *Haemophilus influenzae* csokoládé agaron



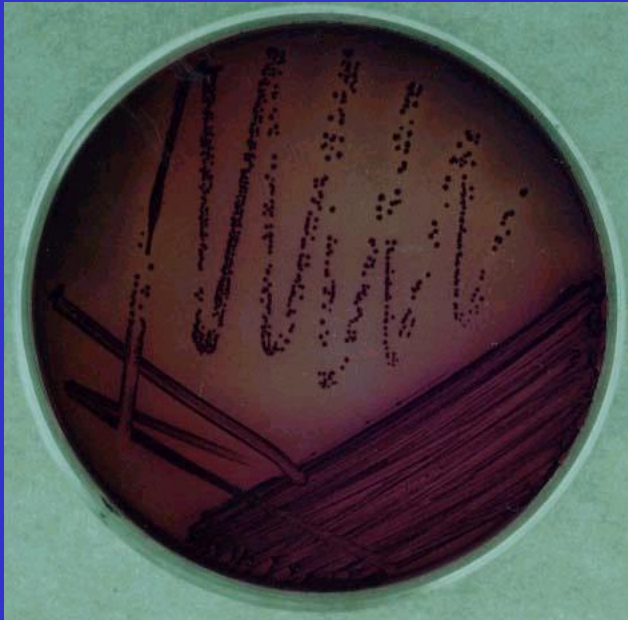
„Harmatcsepp-szerű” telepek,
erős takonyszag!



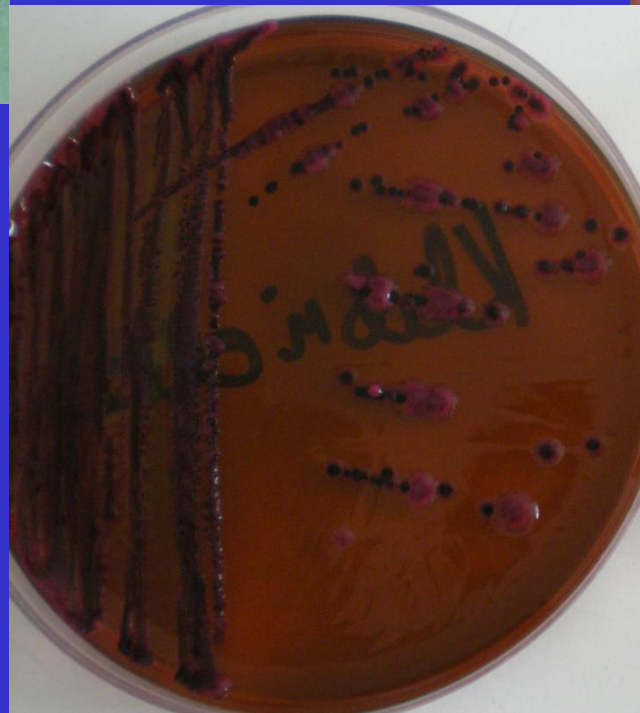
9/12. *E. coli* és *Klebsiella* agar lemezen



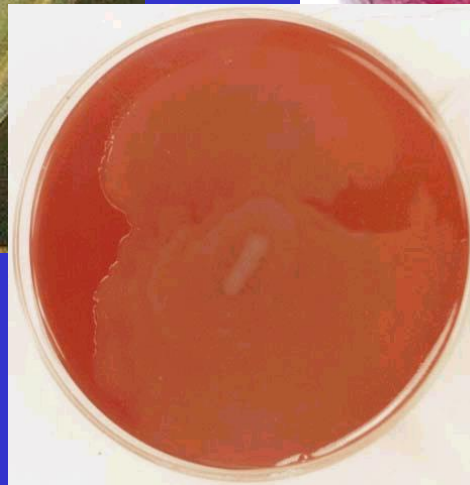
9/12. *E. coli* és *Klebsiella* EMK táptalajon



M022
Escherichia coli (25922)



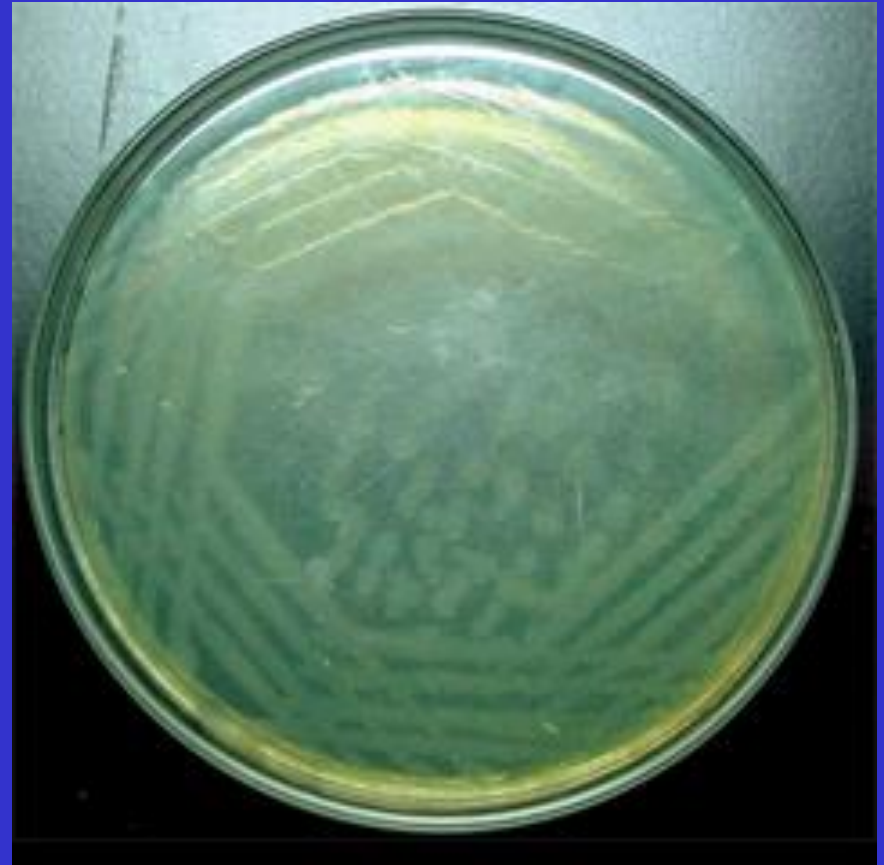
10. *Proteus* agar lemezen (rajzás!) és eozin metilénkék táptalajon



11. *Pseudomonas* lemez agaron



Pseudomonas aeruginosa

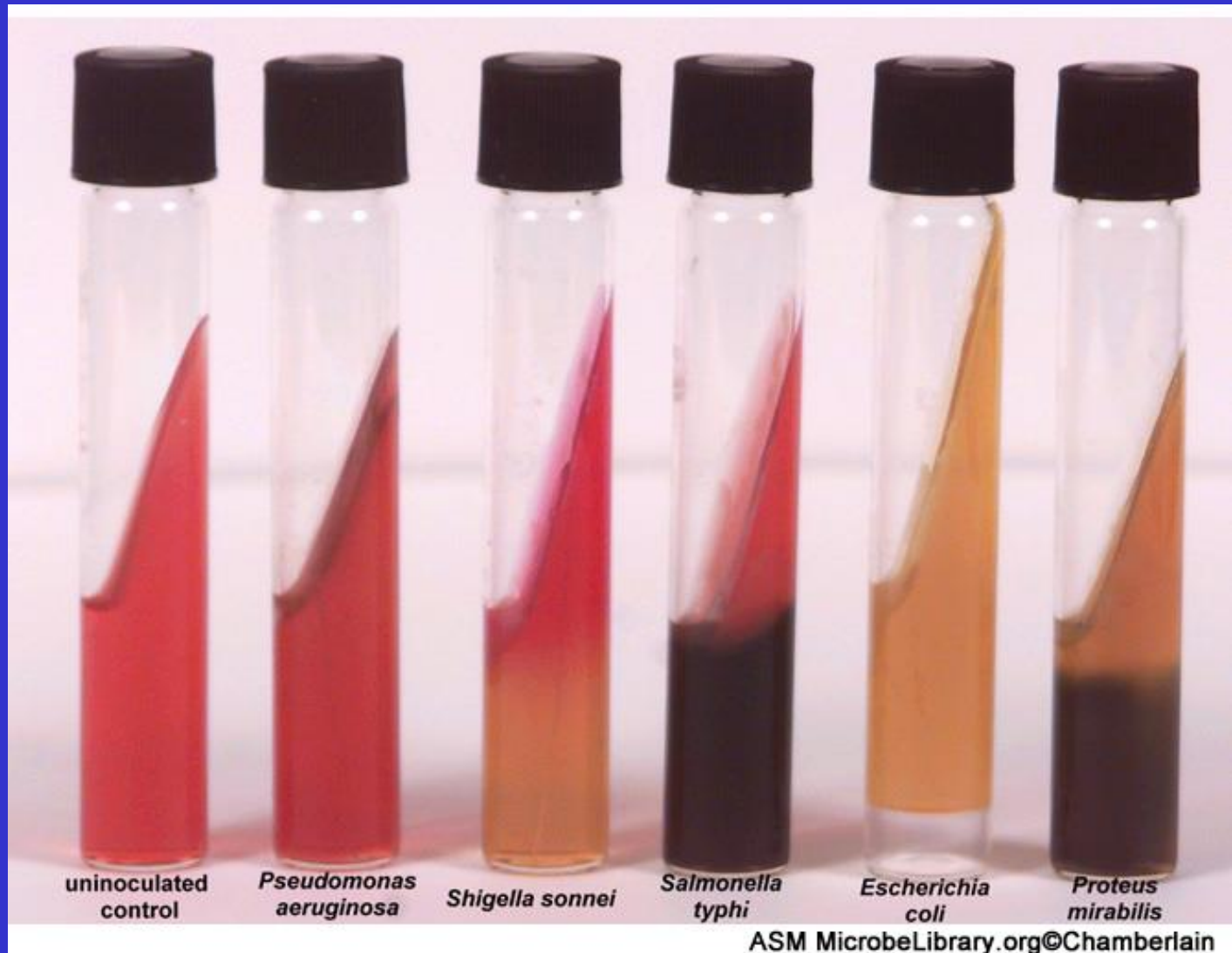


- Zöld pigment!!!
- Kellemes illat
- Mukoid telepek

13. *Salmonella* bizmut szulfit táptalajon



16. TSI táptalaj



17. Ureáz teszt (Christensen táptalaj)

- $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ (ureum) $\rightarrow$ $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ (ammónia)
- Christensen médium:
indikátor (fenolvörös)
 - ureáz +: **püspöklila**
 - ureáz -: citromsárga



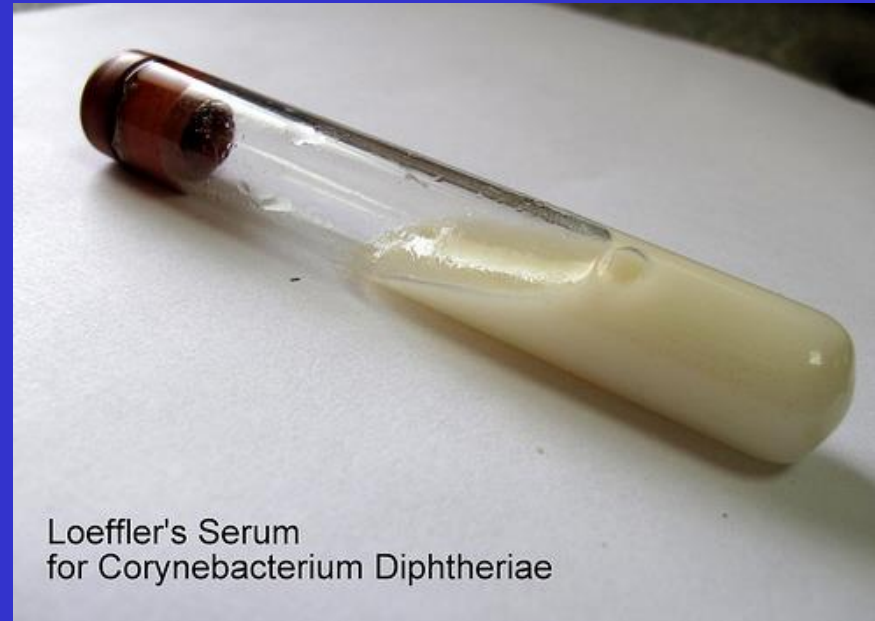
05.05

Ureáz +: *Proteus, Klebsiella, Helicobacter*

18. *Corynebacterium* Clauberg és Löffler táptalajon



Clauberg

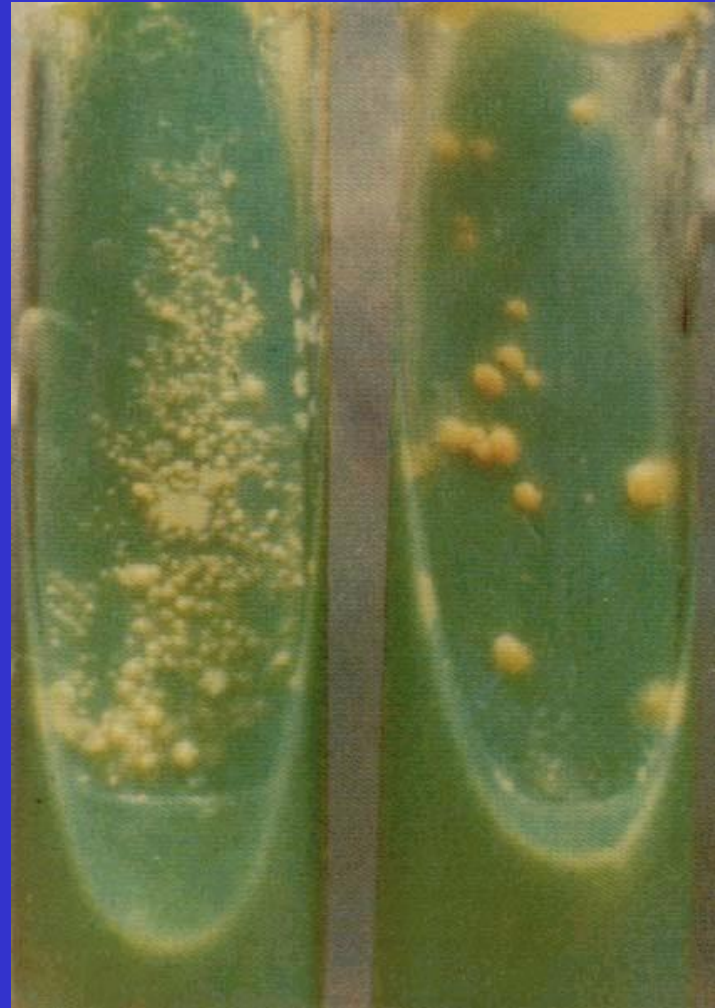


Loeffler's Serum
for *Corynebacterium Diphtheriae*

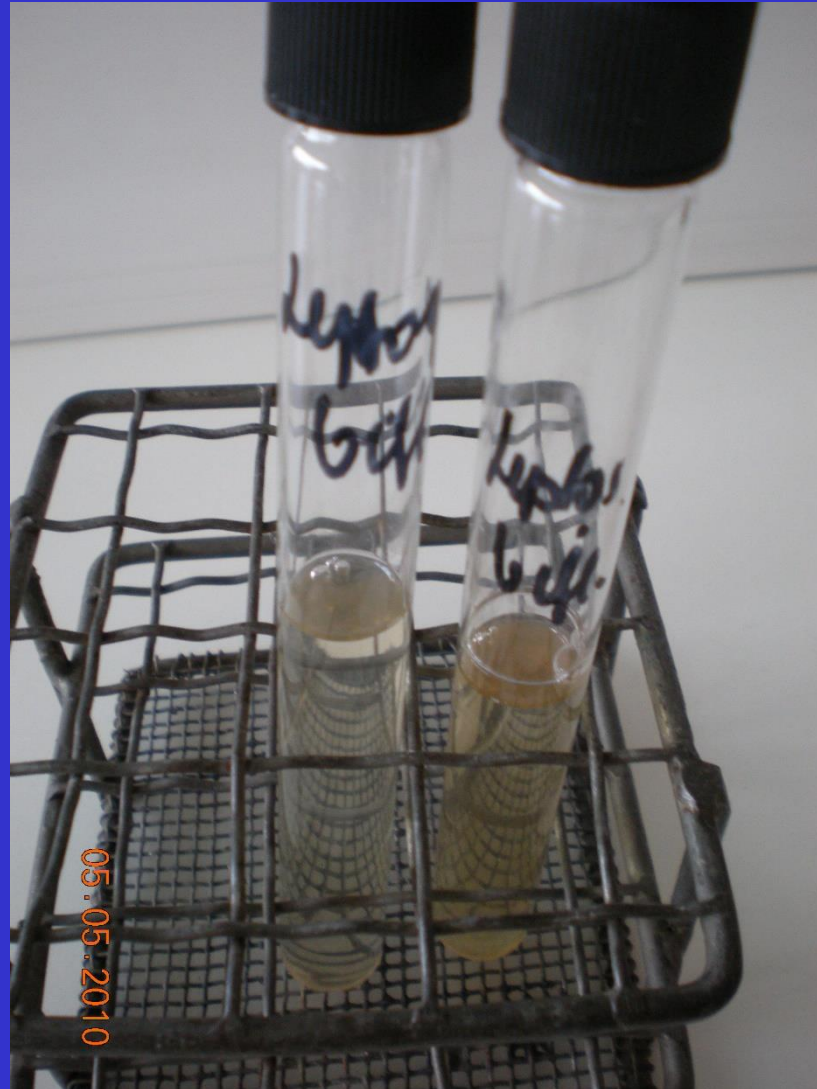
Löffler

19. *Mycobacterium tuberculosis*

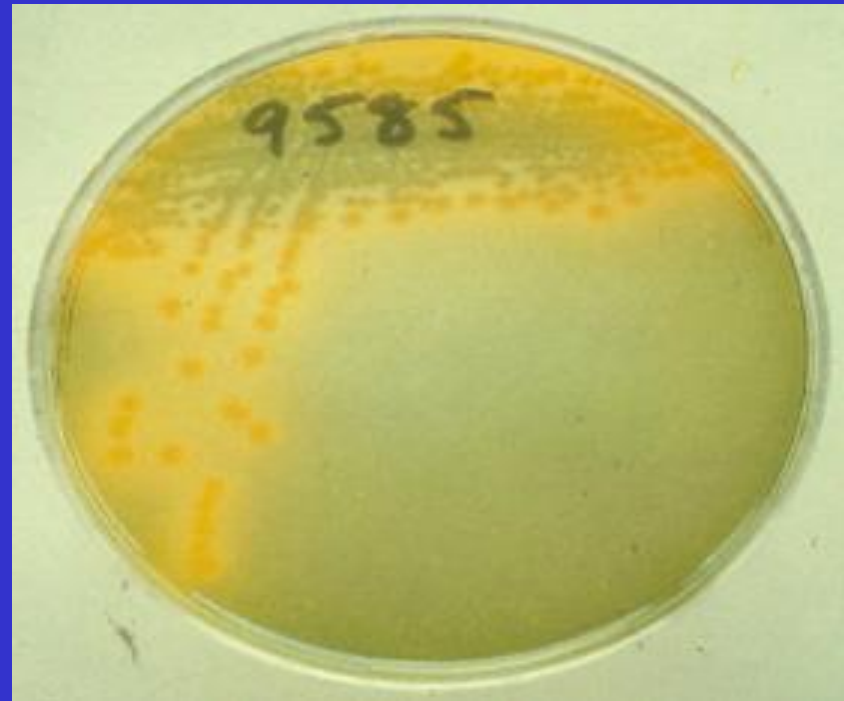
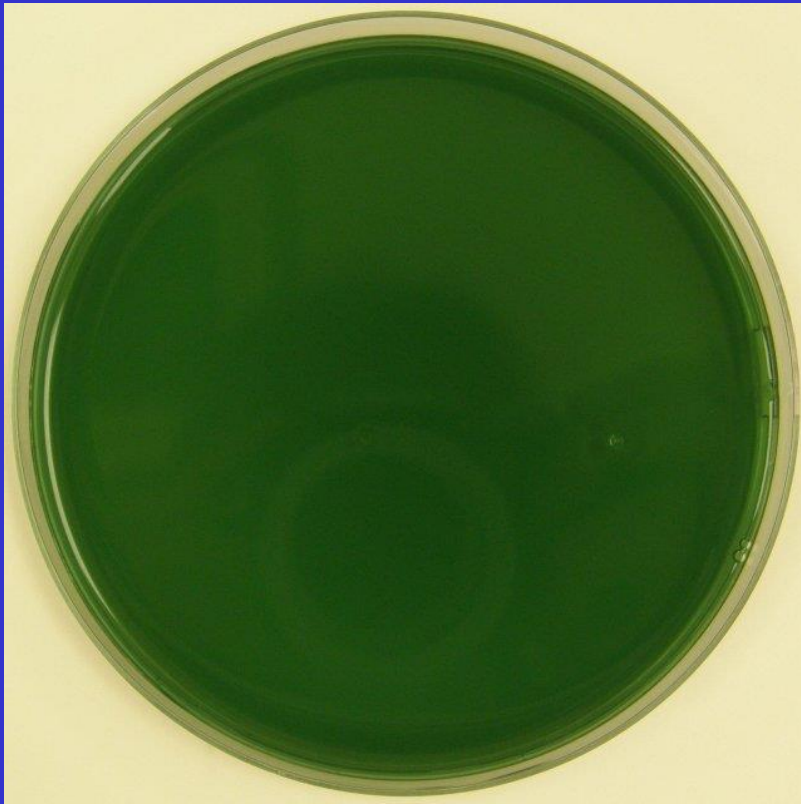
Löwenstein-Jensen táptalajon



20. *Leptospira* Korthof táptalajon



21. TCBS táptalaj



Vibrio cholerae

22. *B. cereus* agaron és véres agaron



23-24. *Clostridium tetani* és *C. perfringens* Holman és thioglikolát táptalajon



GasPak



III. Reakciók és módszerek

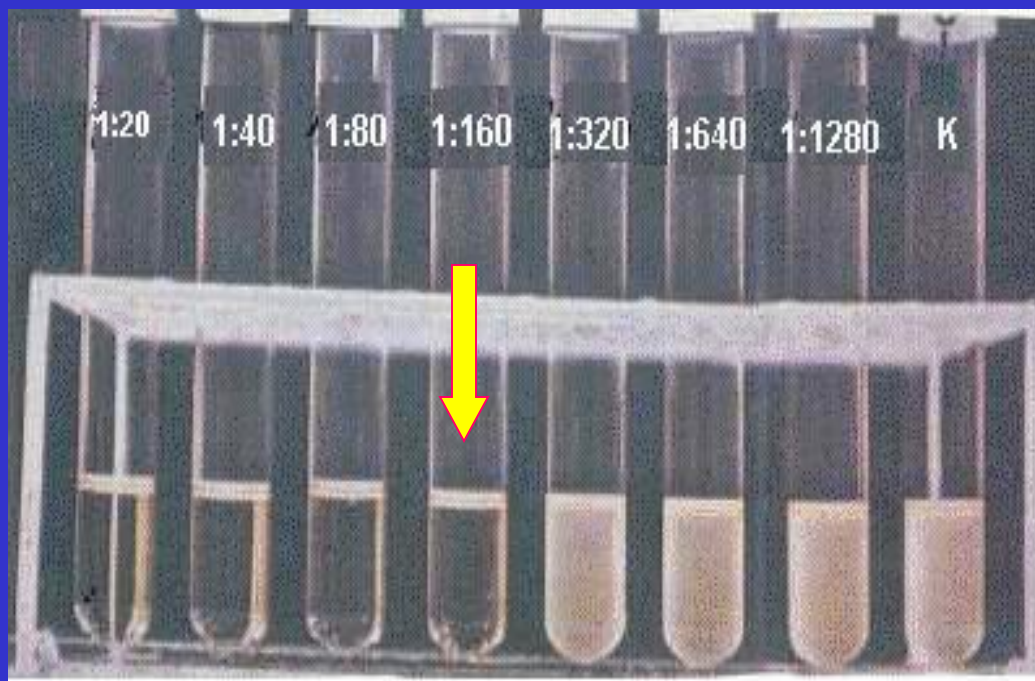
1. Widal-típusú csősorozat agglutináció

(a) Gruber-Widal: hastífusz (*Salmonella*)

(b) Weil-Felix: kiütéses tífusz (*Rickettsia*) —————→ *Proteus* OX19

(c) Wright: *Brucella*

antigénnel!



Titer: az a legkisebb mennyiségű antitest, ami még pozitív reakciót képes eredményezni !!!

Paul-Bunnell reakció

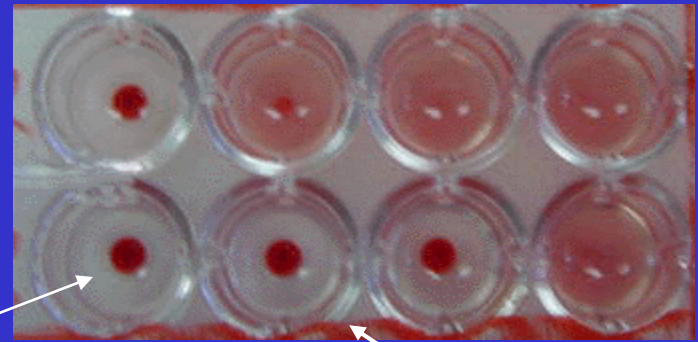


- Mononucleosis infectiosa esetén
- EBV: P-B pozitív
- CMV: P-B negatív
- Beteg ellenanyaga birka vörösvértestet kicsapja

2. Wasserman teszt, szifilisz (KKR)

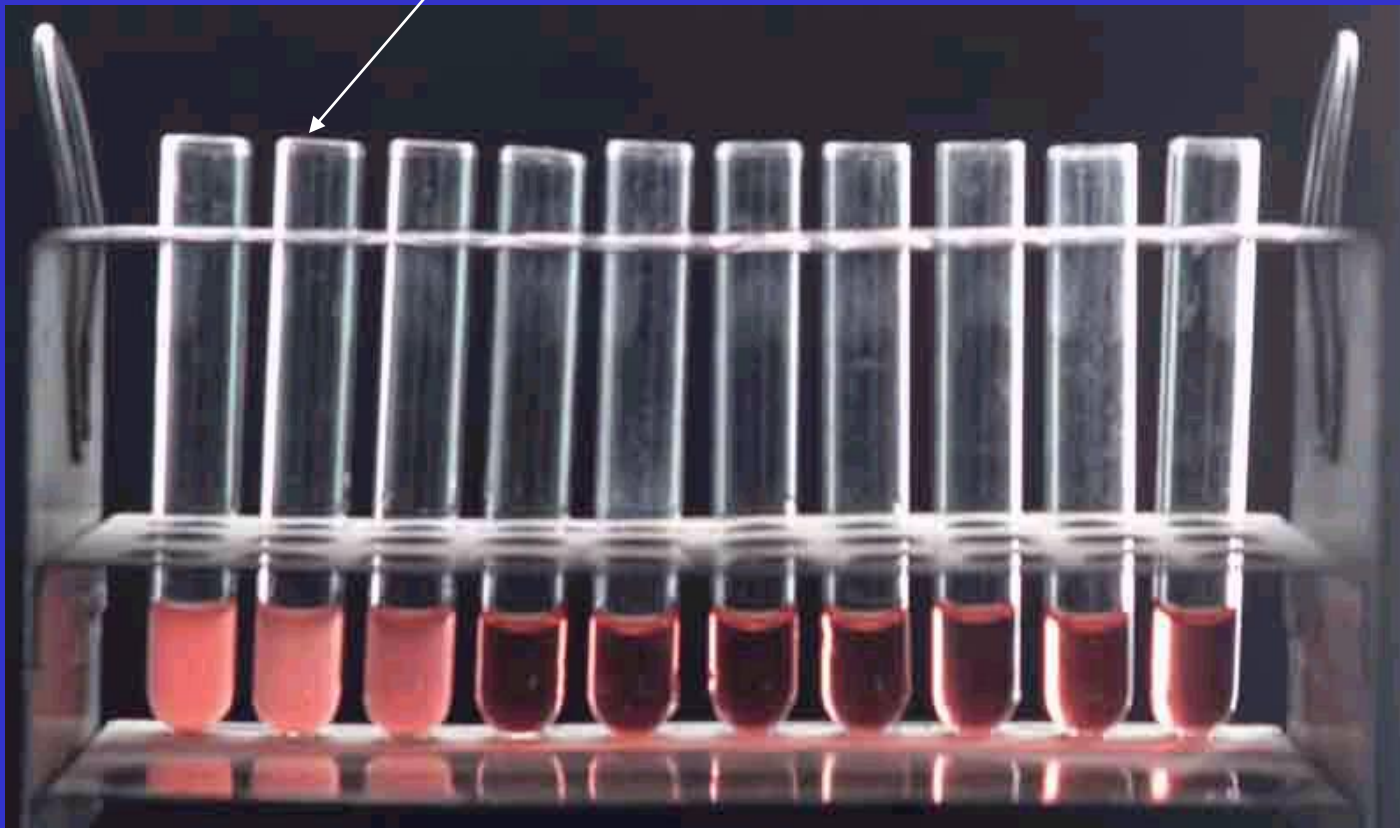
1

2



Pozitivitás:
nincs hemolízis

2: 4-szeres
titeremelkedés
1-hez képest:
fertőzés



3. Hemagglutináció gátlás (Rubeola)

NEG K	POZ K	A savópár 1. minta	A savópár 2. minta	B savópár 1. minta	B savópár 2. minta	B savó 2. minta össz- ellenanyag	B savó 2. minta IgM eltávolítás
1:320							
1:160							
1:80							
1:40							
1:20							
1:10							

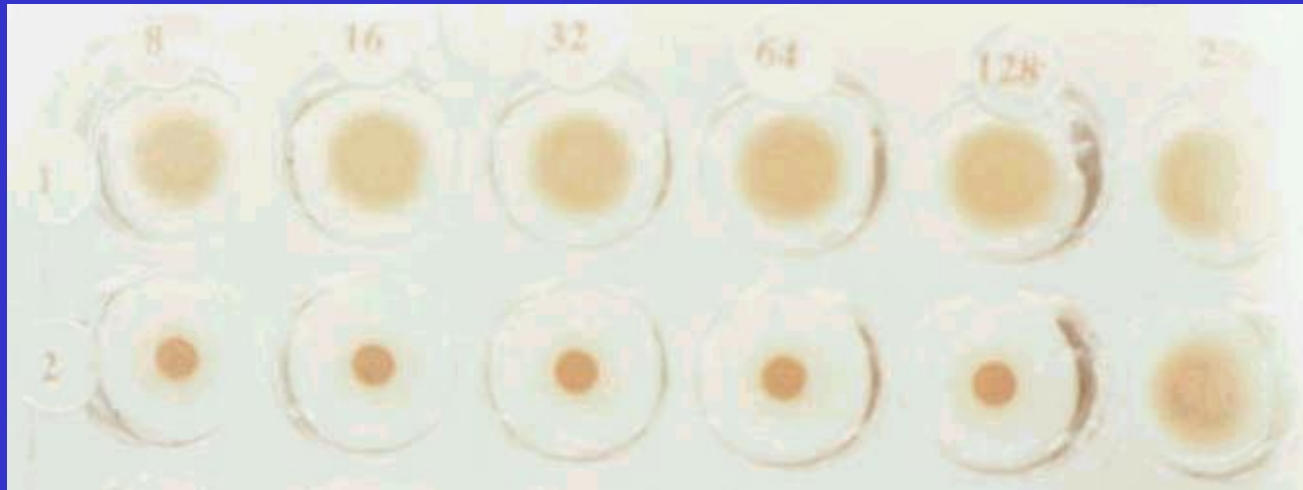
hemagglutináció



hemagglutináció
gátlás



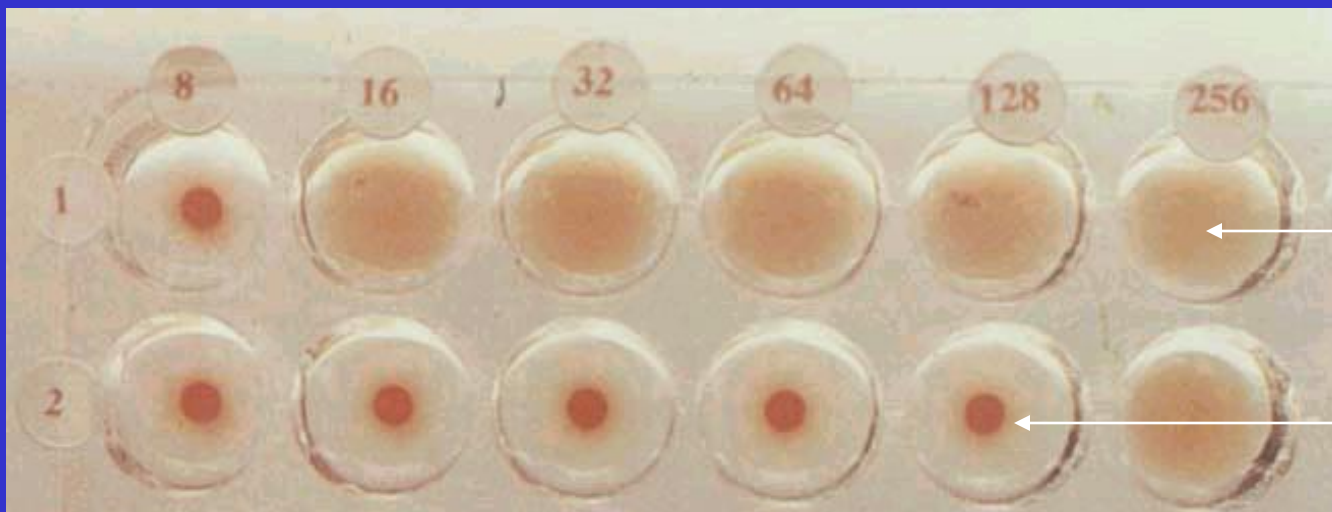
3. Hemagglutináció (HA) és -gátlás (HAG)



hemagglutináció

hemagglutináció
gátlás

Komplement kötési reakció



hemolízis (-)

nincs hemolízis
(+)

Hepatitis ELISA

	anti-HAV			anti-HCV			HBsAg			anti-HBsAg		
	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S
1. beteg	○	●	○	●	○	○	●	○	○	○	●	●
2. beteg	○	●	○	●	○	○	●	○	○	○	●	●
3. beteg	○	●	●	●	○	○	●	○	○	○	●	○
4. beteg	○	●	●	●	○	○	●	○	●	○	●	●

anti-HAV: kompetitív
ELISA, 1. beteg pozitív
(átesett a fertőzésen vagy
oltott)

anti-HCV: 2. beteg pozitív,
(HCV-vel fertőzött)

HBsAg: 4. beteg pozitív,
(HBsAg hordozó)

anti-HBsAg: kompetitív
ELISA 3. beteg pozitív,
(HBV fertőzés ellen védett)

HIV szűrés

- A HIV szűrésnél az első vizsgálathoz a legmagasabb szenzitivitású tesztet kell alkalmazni, például 4. generációs enzim immuno-assay-t, amely egyidejűleg alkalmas a HIV-1 és HIV-2 ellenanyagok valamint a HIV-1 p24 antigén kimutatására. Az egyértelműen negatív eredmény kiadható. Határzónába eső vagy reaktív* minta esetén a vizsgálatot 2 párhuzamos vizsgálattal meg kell ismételni. Ha mindkét vizsgálat negatív, akkor az eredmény kiadható. Ha az ismételt vizsgálat során a párhuzamosan végzett két vizsgálat közül legalább az egyik nem negatív, akkor a vizsgált személytől második mintát kell kérni és mindkét mintát a verifikáló laboratóriumba kell küldeni.
- *amíg a verifikálás nem történik meg, nem nevezhetjük pozitívnak

A következő betegeken mutatjuk be a HIV-diagnosztikát:

- **T-81 minta:** 45 éves férfi beteg, gasztroenterológia küldi be, cachexia, lymphocytopenia, m.o. pneumonia.
- **T-82 minta:** 43 éves nőbeteg, haematológiai osztály küldi be bizonytalan, elhúzódó tünetekkel, kóros vérképpel. Anamnézisében több év nyugat-afrikai tartózkodás, kinti partnerek.
- **T-83 minta:** 57 éves krónikus vesebeteg férfi, Dialízis Központ küldi be a szokásos éves ellenőrző vizsgálatra.
- **T-84 minta:** Fiatal férfi, az anonim vérvételi helyen jelenik meg férfi partnerével. A counselling keretében elmondja, hogy a jelenlegi partnere előtt több bizonytalan kapcsolata volt, most ez egy új kapcsolat, ezért jöttek el együtt szűrővizsgálatra.
- **T-42 minta:** 21 éves férfi. 3 hete egy swingertparty-n vett részt, részeg volt, ezért nem védekezett. Több ismeretlen résztvevővel lépett szexuális kapcsolatba, aggódik, hogy elkapott valamit.

A lemezen a következő bemérések vannak:

- A1-B1 negatív kontroll
- C1-D1 pozitív kontroll: HIV-1 ellenanyag tartalmú
- E1-F1 pozitív kontroll: HIV-2 ellenanyag tartalmú
- G1-H1 pozitív kontroll: HIV-1 p24 antigén tartalmú
- A2-B2 T-81 minta: reaktív, az előzőleg reaktívnek bizonyult minta ismétlése duplikátban
- C2-D2 T-82 minta: reaktív, az előzőleg reaktívnek bizonyult minta ismétlése duplikátban
- E2-F2 T-83 minta : negatív, az előzőleg reaktívnek bizonyult minta ismétlése duplikátban
- G2-H2 T-84 minta: reaktív, az előzőleg reaktívnek bizonyult minta ismétlése duplikátban
- B8 T-42 minta: reaktív, következő beállításban duplikátban ismételni kell
- F11 T-70 minta: reaktív, következő beállításban duplikátban ismételni kell
- A többi bemért minta negatív eredményt adott.



A szűrővizsgálat értékelése:

- **Verifikálás** (megerősítő vizsgálat) szükséges 3 minta (**T-81, T-82, T-84**) esetében.
- A **T-83-as minta** kiadható **negatív**nak.
- A **T-42-es minta** az ELISA kötelező **megismétlése** során reaktívnek bizonyult, így ez is verifikálásra került.

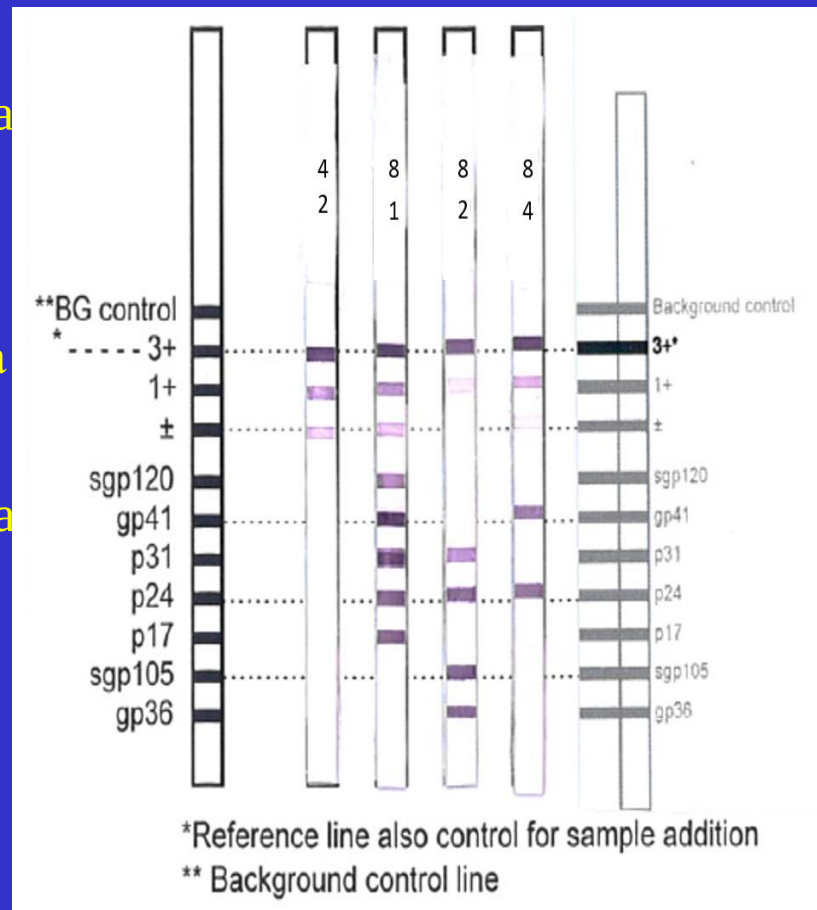
HIV megerősítő vizsgálatok

- Immunoblot technikával (Line-Immuno Assay vagy Western-blot)
- kimutathatók az egyes HIV antigének elleni ellenanyagok
- a HIV-1 és HIV-2 fertőzés elkülöníthető.

Értékelés:

A felső 4 csík kontrollcsík, mely belső negatív és pozitív kontrollként szolgál. Az sgp120 és a gp41 fehérjék elleni ellenanyag a HIV-1 fertőzésre, a sgp105 és a gp36 fehérjék elleni ellenanyag a HIV-2 fertőzésre jellemzőek.

- **T-42 minta** ELISA-val reaktív, immunoblotta nem mutatható ki ellenanyag (negatív). Korai HIV-fertőzés esetén, ha a szűrőmódszer pozitivitást jelez, de az immunoblot negatív (még nem alakultak ki az ellenanyagok), nukleinsav amplifikációval lehet bizonyítani a HIV fertőzést. A T-42 minta **PCR vizsgálata pozitív** lett, ami korai HIV-fertőzést jelent.
- **T-81 minta:** ELISA-val reaktív, immunoblotta HIV-1 ellenanyagok kimutathatóak: HIV-1 fertőzés (a sok epitóp elleni ellenanyag előrehaladott HIV fertőzésre utal).
- **T-82: minta:** ELISA-val reaktív, immunoblottal HIV-2 ellenanyagok kimutathatóak: HIV-2 fertőzés
- **T-84 minta:** ELISA-val reaktív, immunoblottal HIV-1 ellenanyagok kimutathatóak: HIV-1 fertőzés



6. Gram festés lépései

1/a. Kristályibolya 2'



1/b. Lugol oldat 1'



2. Differenciálás 96 %-os alkohollal

3. Vizes mosás

4. Safranin 1'



5. Vizes mosás

6. Szárítás szűrőpapíron

7. Mikroszkópos vizsgálat (immerzió)

7. Neisser festés menete

(*Corynebacterium diphtheriae* speciális festése)

- Neisser-I (=metilénkék) 2 adag
Neisser-II (=kr. ibolya) 1 adag } frissen → 10'

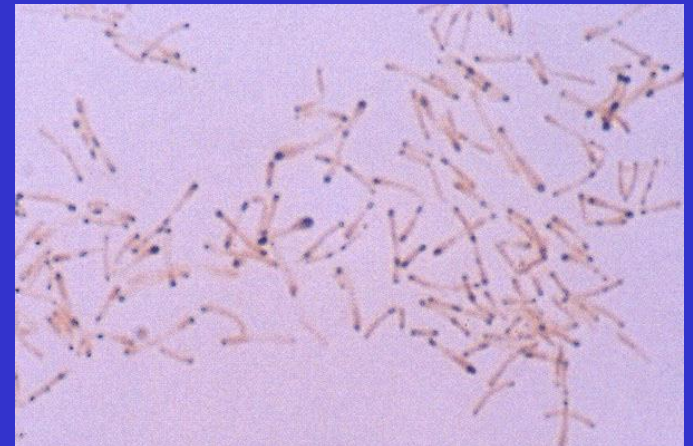
- vizes mosás

- krizoidin 1-2'

- fölösleges festéket elönteni,
szárítás szűrőpapírral

- mikroszkópos vizsgálat
(immerzió!)

Szemcsék: ecetsav hatására
festődnek (savanyúbbak a
baktériumnál)

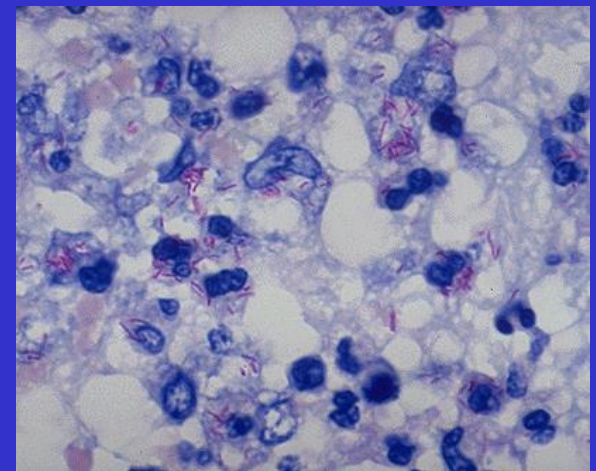


8. Ziehl-Neelsen festés menete

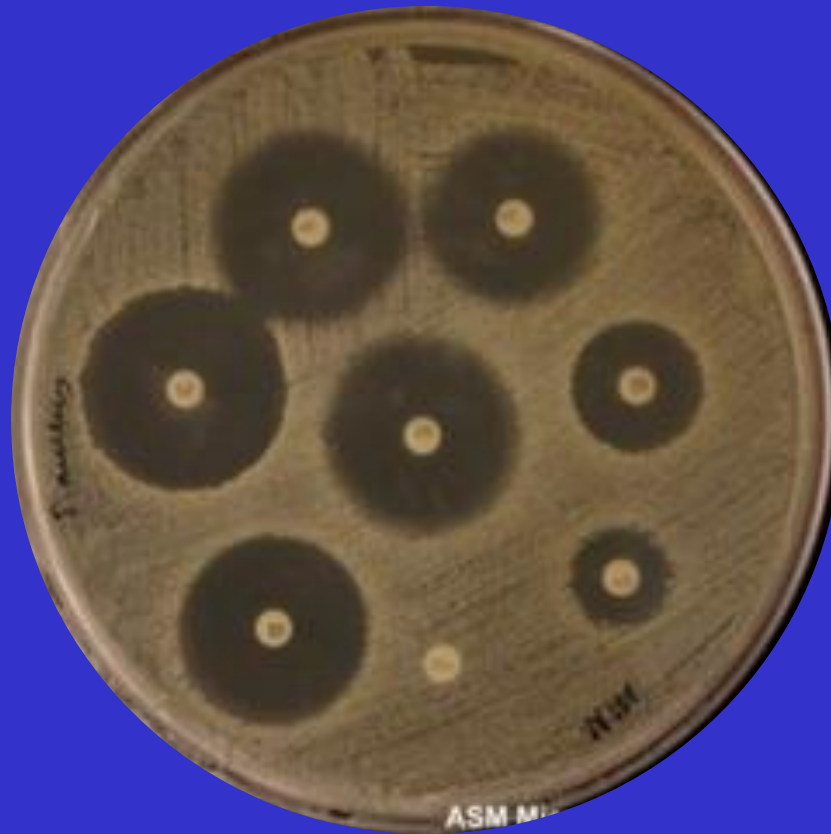
“saválló festés”

(*Mycobacterium*ok speciális festése)

- Karbol-fuchsin (szűrőpapíron!)
 - alámelegítés 3x (amíg gőzölni kezd)
- Differenciálás: sósavas alkohollal
 - 3% HCl, 96% etanol
 - “saválló”
- alapos vizes mosás
- utánfestés 1-2’
 - metilénkék vagy malachitzöld
- óvatos öblítés, leitatás papírral



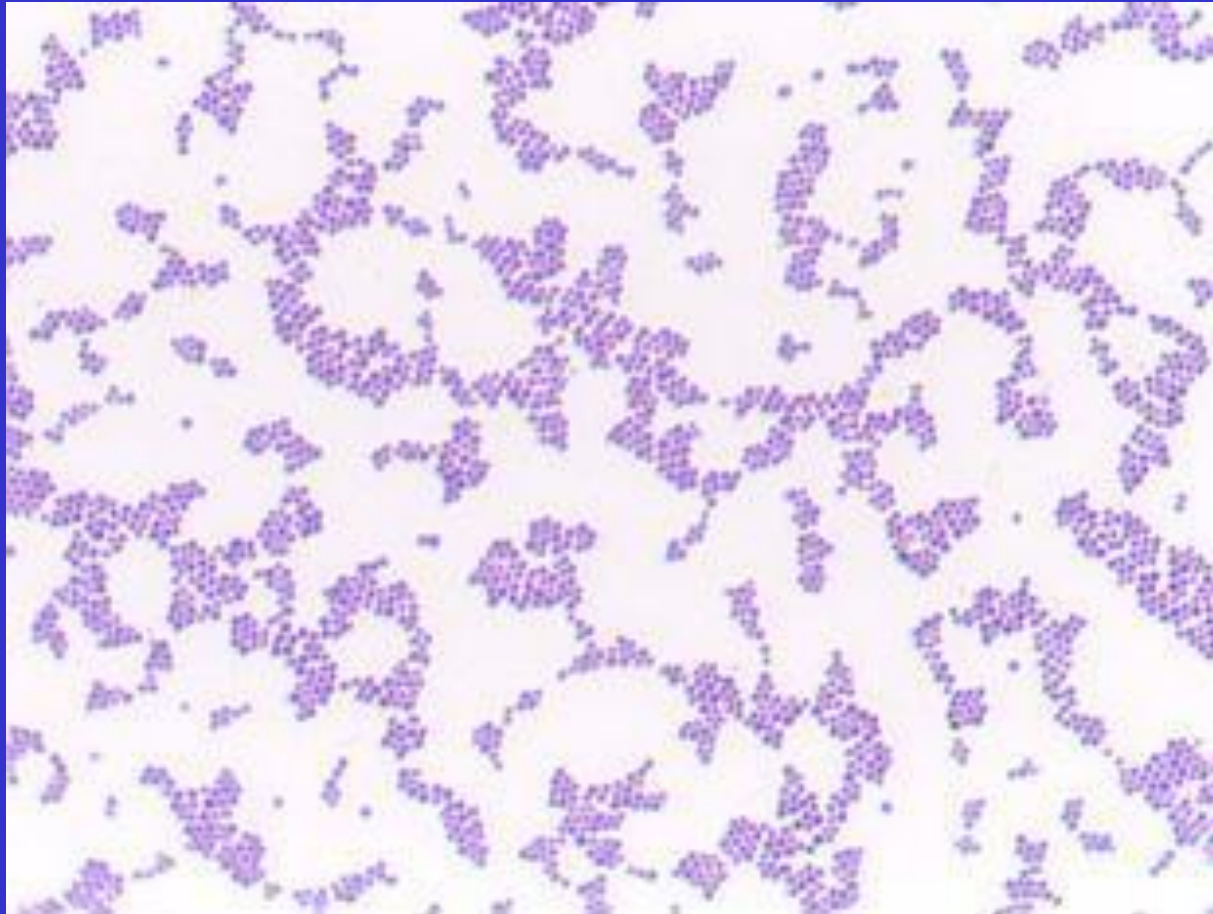
9. Antibiotikum érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel (“antibiogram”)



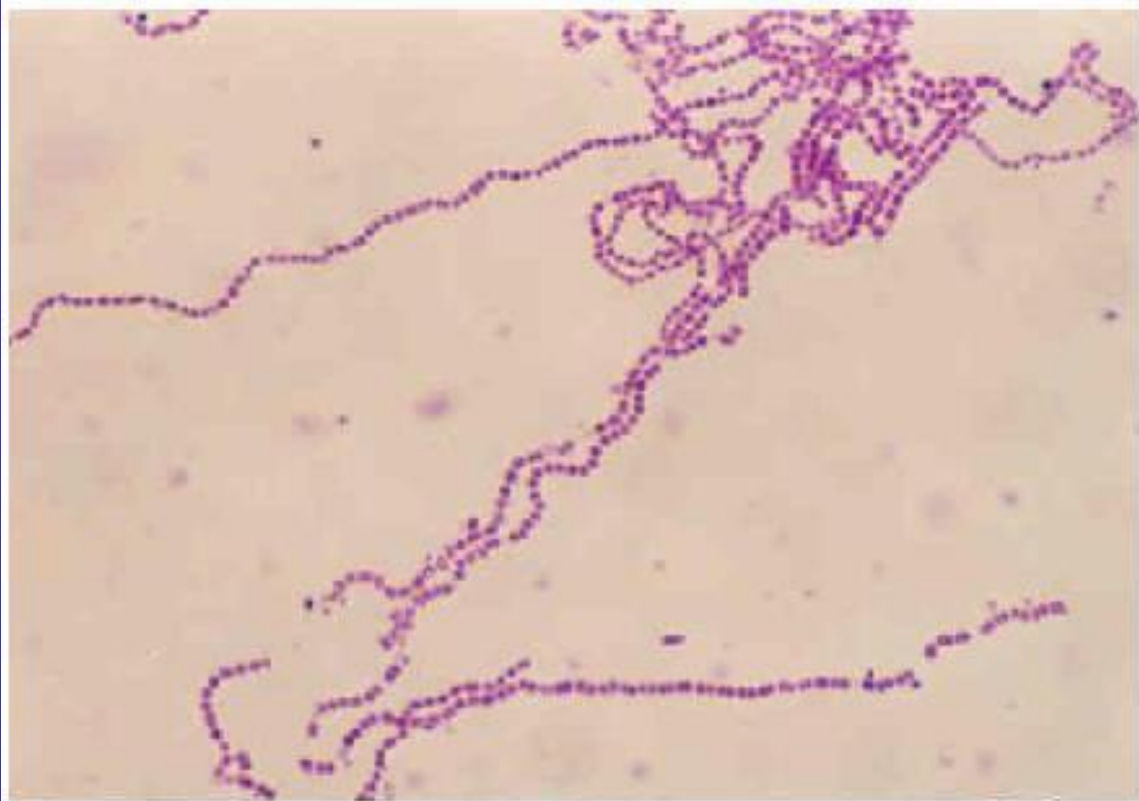
IV. Mikroszkópos készítmények

Gram-festéssel

Staphylococcus (Gram +)



Streptococcus pyogenes (Gram +)



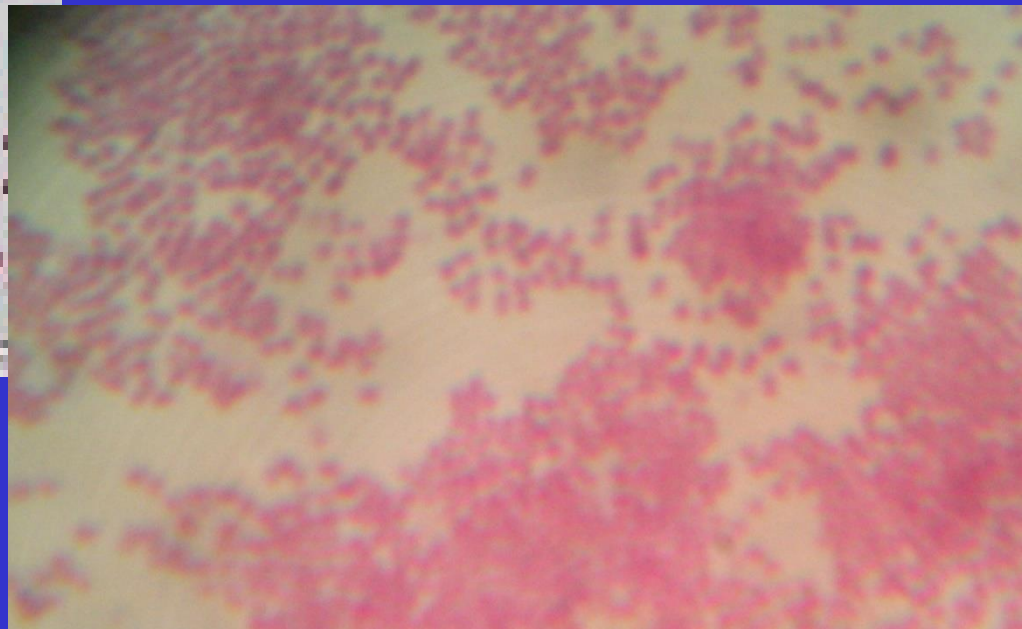
Gram pozitiv coccus (*Streptococcus pyogenes*)



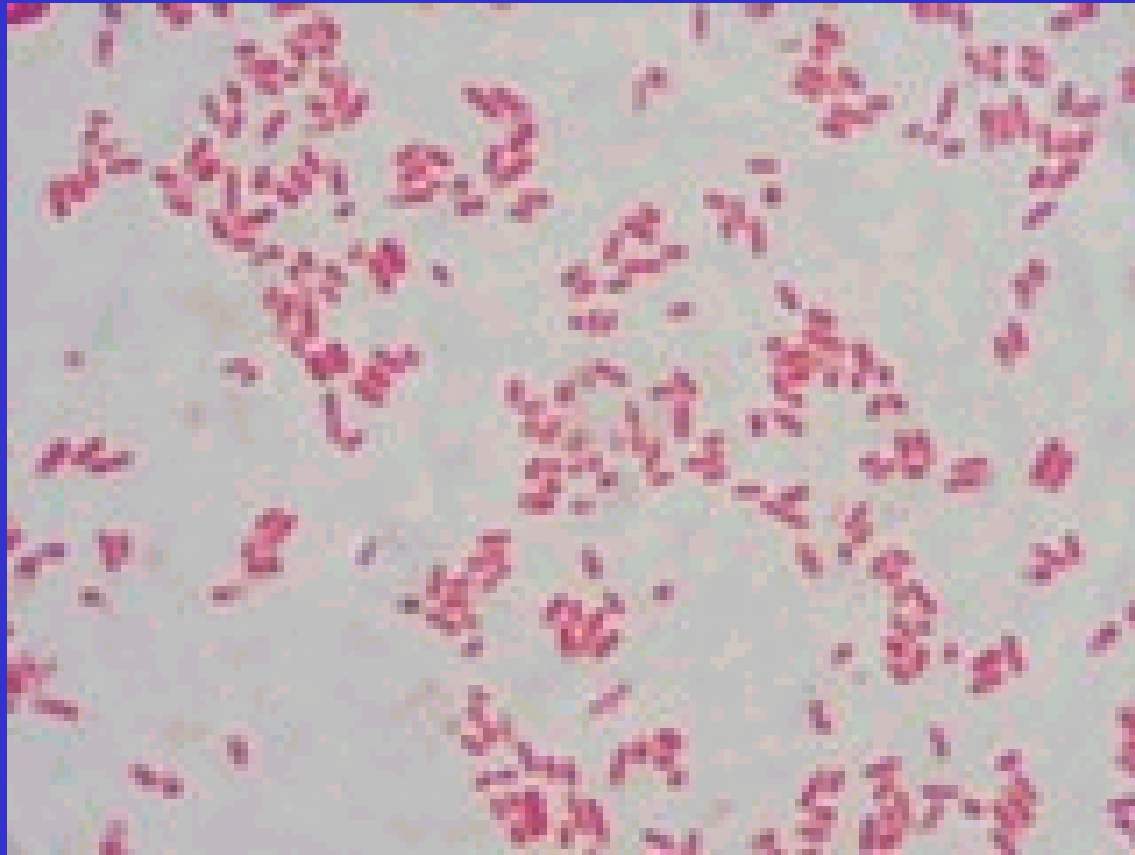
Streptococcus pneumoniae (G +)



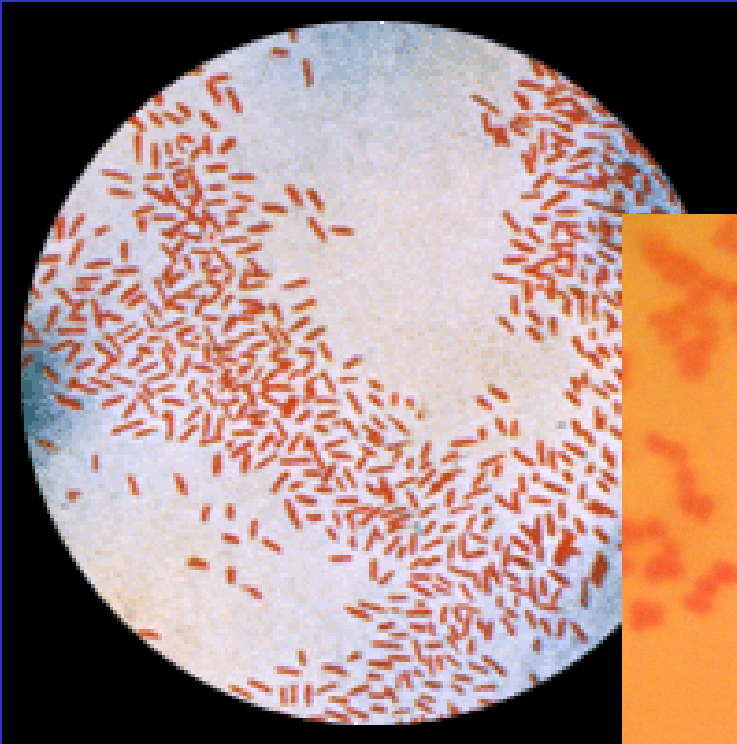
Neisseria (Gram -)



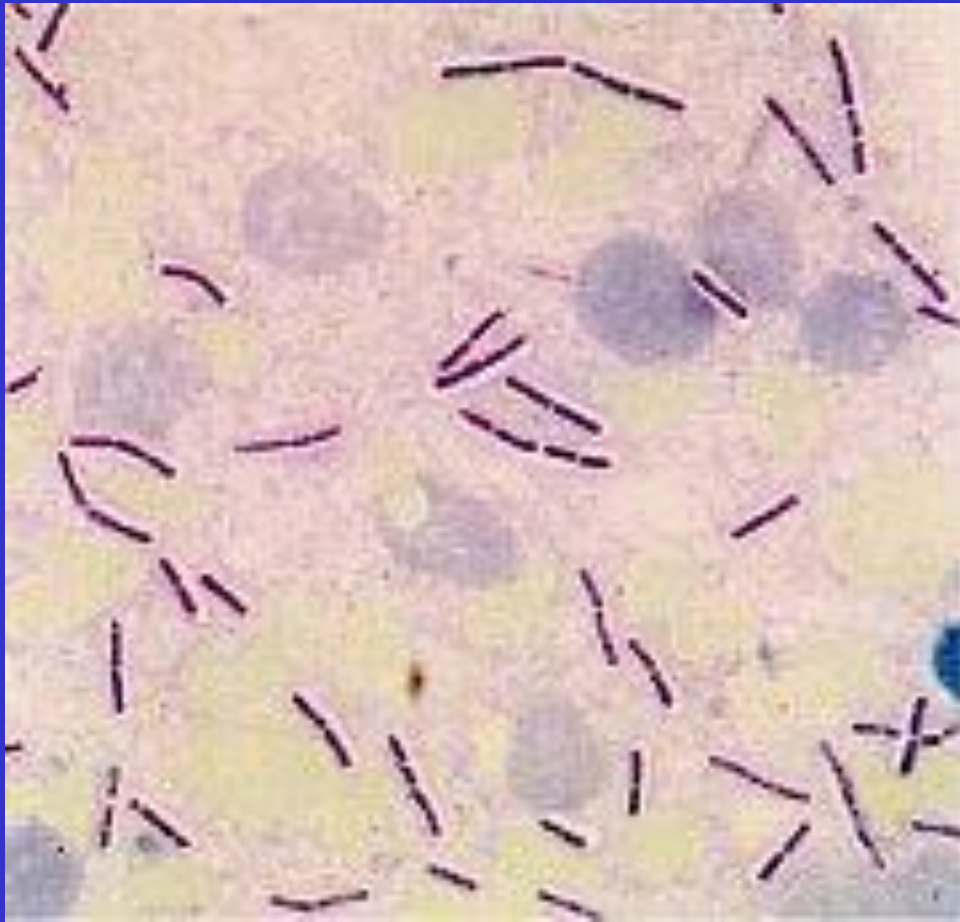
E. coli (Gram -)



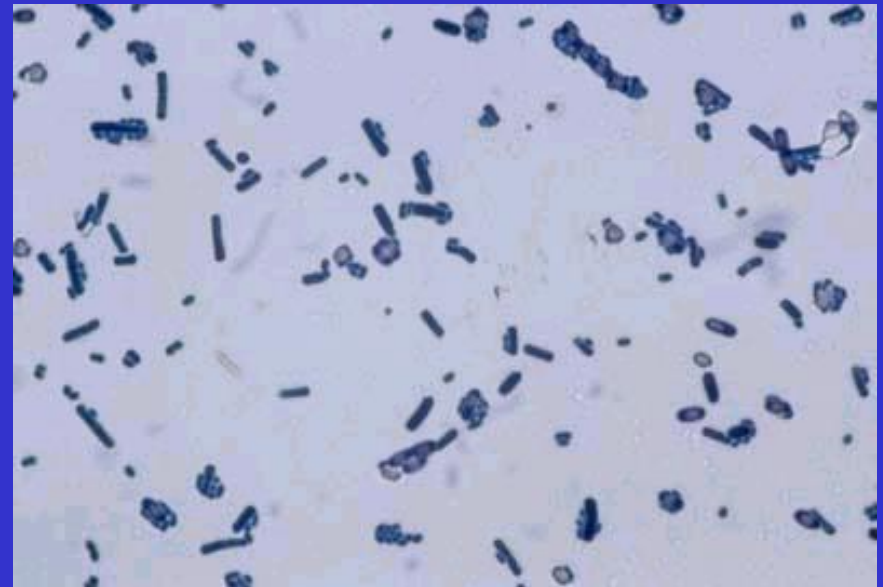
Haemophilus influenzae (Gram -)



Bacillus (Gram + spóraképző pálca)

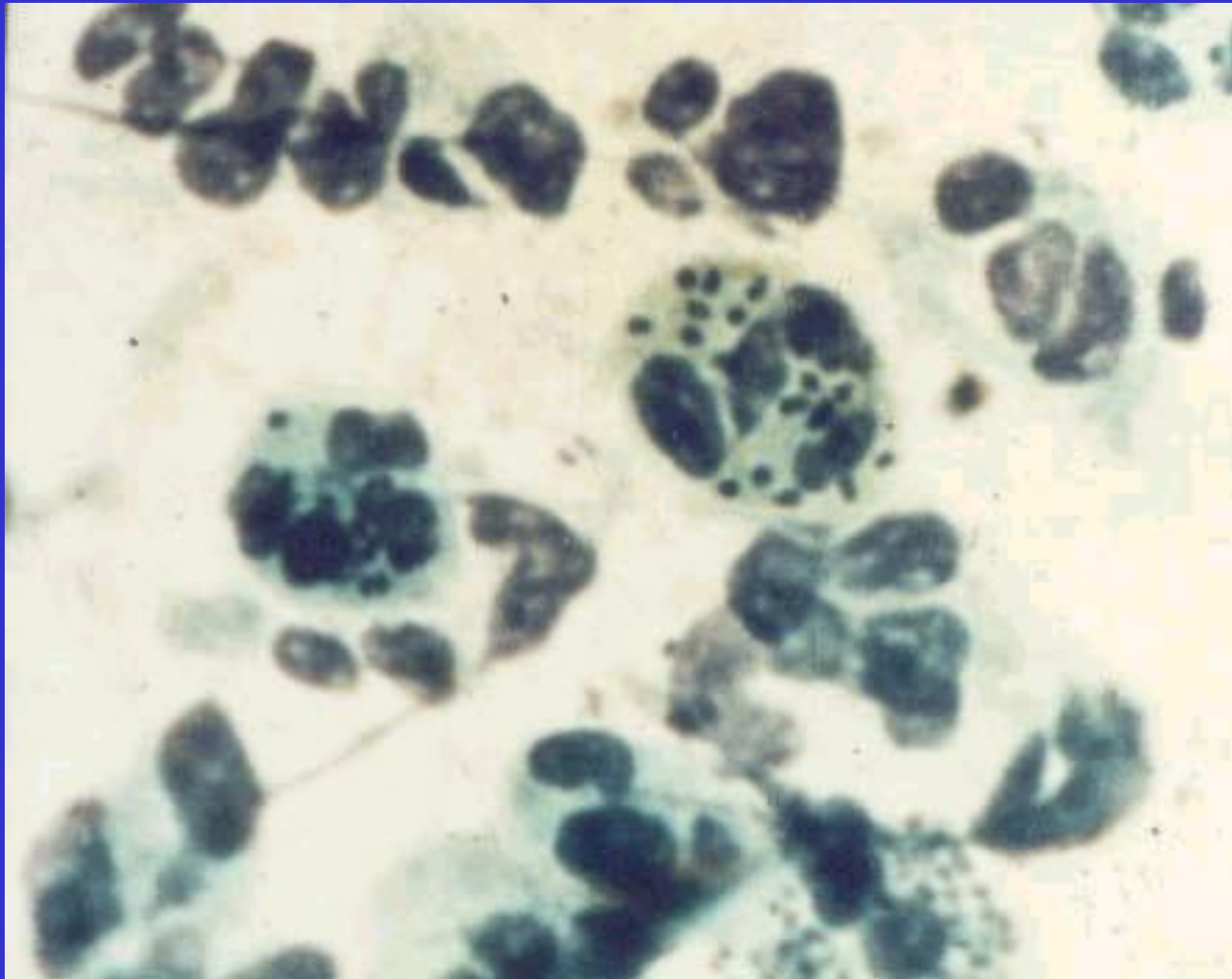


Clostridium tetani és *C. perfringens* (Gram + spóráképző pálcá)

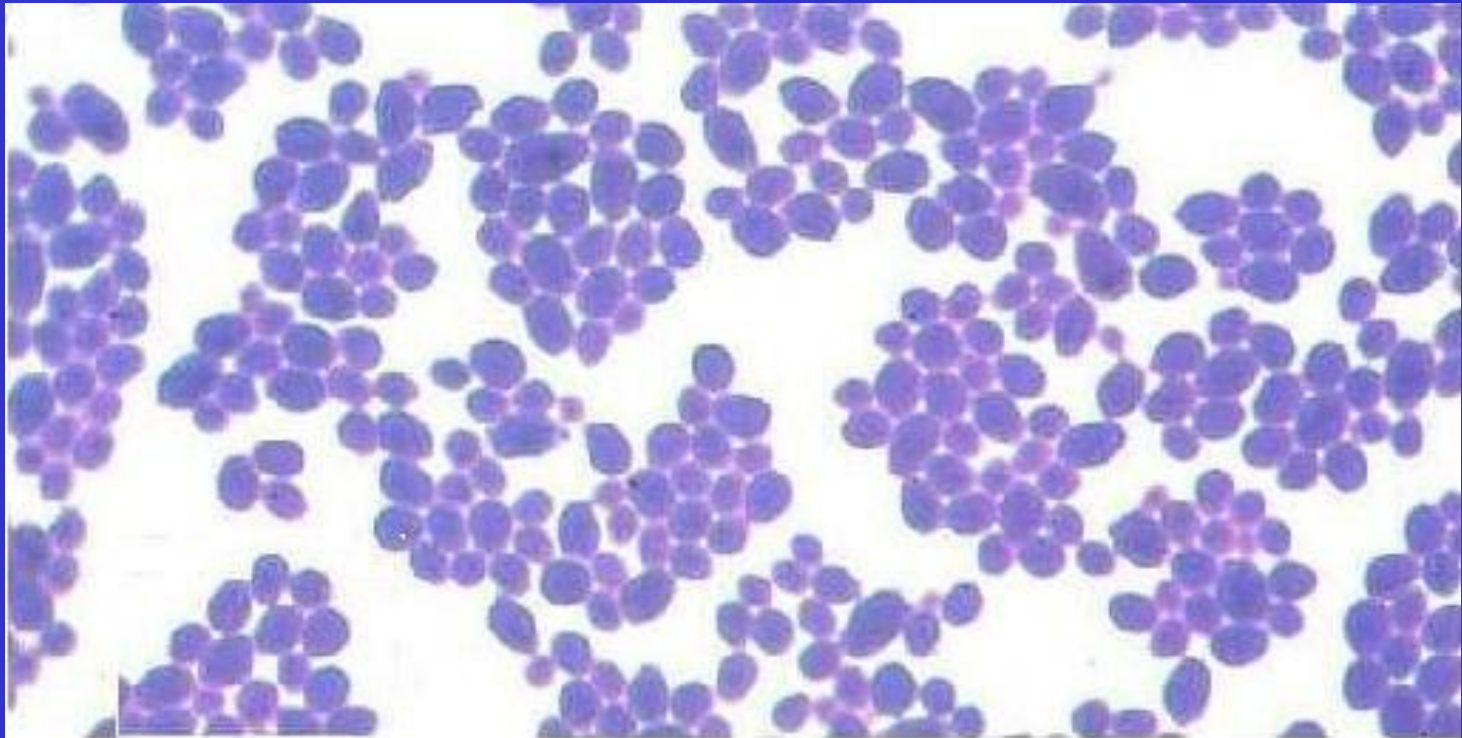


Metilénkék festéssel

Neisseria gonorrhoeae urethra váladékban



Candida albicans tenyészetből



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

Egyéb speciális festések

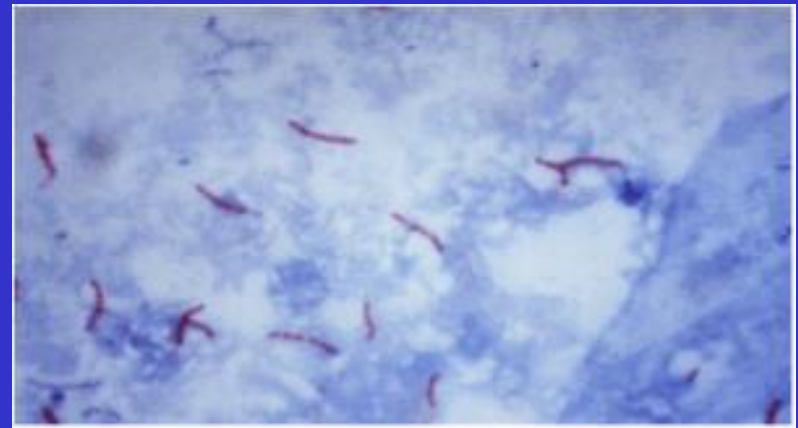
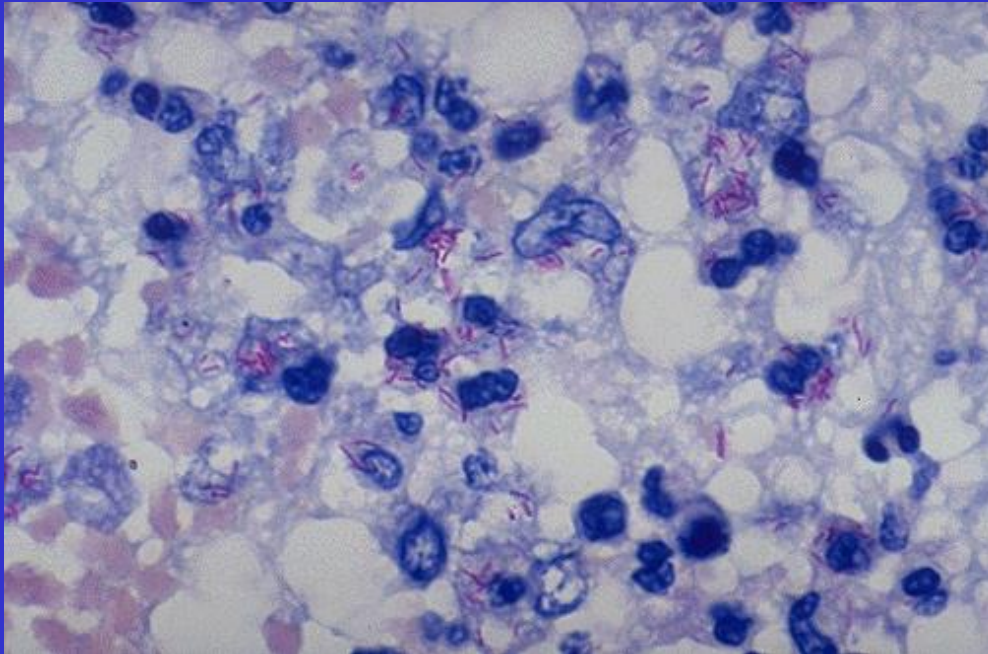
3. *Corynebacterium diphtheriae* - Neisser festés



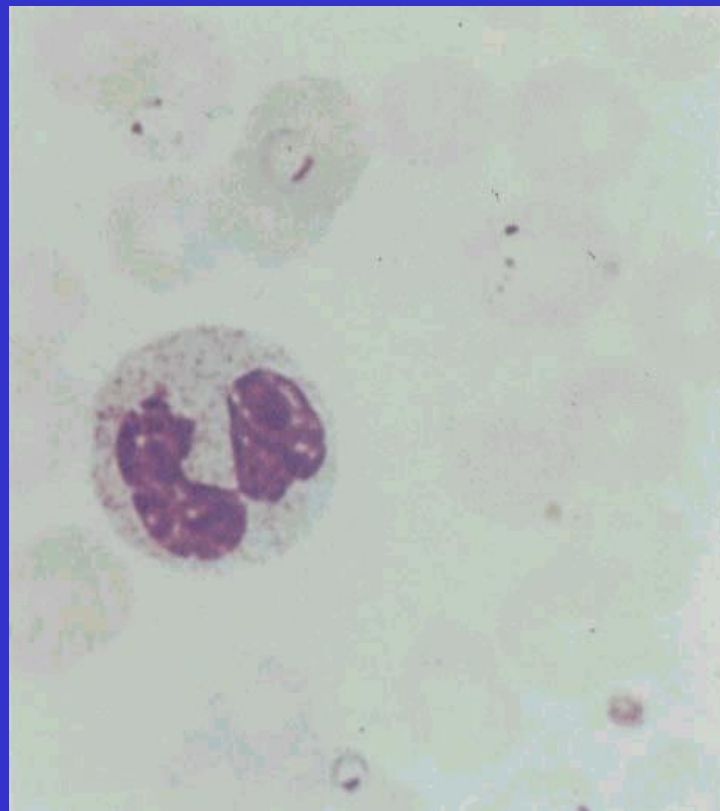
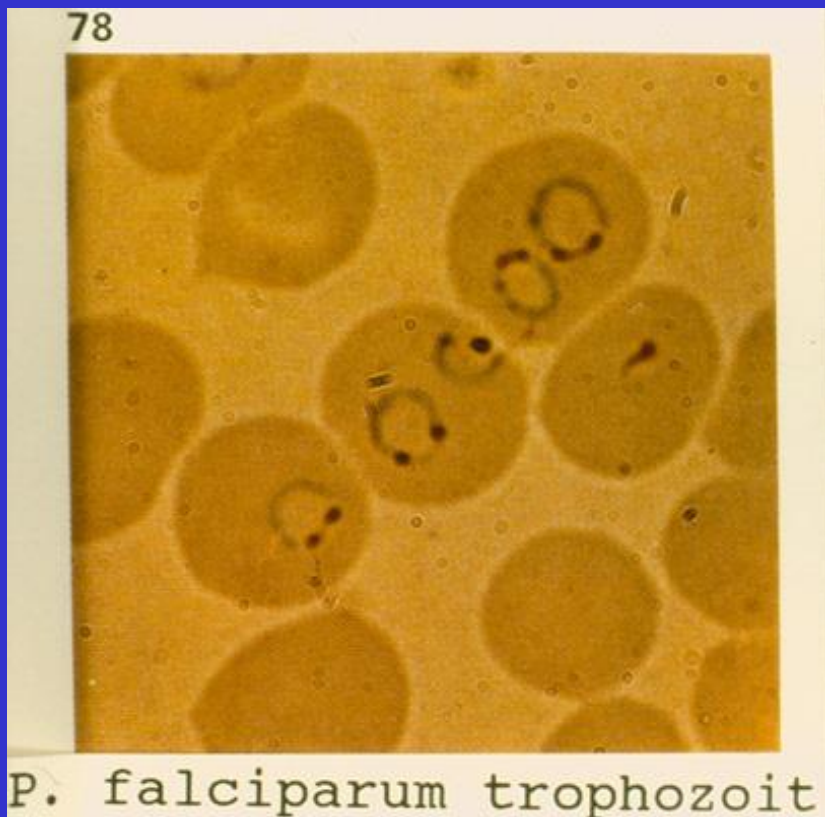
4. Ezüst impregnáció: *Leptospira*



5. Ziehl-Neelsen (saválló) festés: *M. tuberculosis* köpetben



6.a *Plasmodium falciparum* vérkenet (Giemsa festés)



6.b *Trypanosoma brucei* vérkenet (Giemsa festés)



7. Anorectális cellux készítmény (*Enterobius* peték)



VI. Elvégzendő feladatok

Kataláz teszt

Kataláz +: *Staphylococcus*

Kataláz -: *Streptococcus*

- cél: Staph / Strepto elkülönítése
- végrehajtás: H_2O_2 -t csöppentve a tenyészetre, pozitív esetben erős pezsgés tapasztalható
- $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$



Clumping (koaguláz) teszt

Koaguláz +: *Staphylococcus aureus*

Koaguláz -: többi *Staphylococcus* (“*KNS*”)

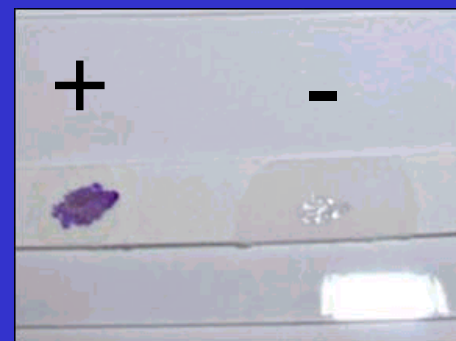
- “**Staphaurex**”: fibrinogénnel bevont latex részecskékkel összekeverve a baktériumokat tárgylemezen → **agglutináció**

(felszíni *endokoaguláz* fibrinogént köt)

Oxidáz teszt

Oxidáz +: *Pseudomonas, Neisseria, Vibrio, Campylobacter*

- **cél:** citokróm-oxidáz enzim kimutatása
- diagnosztikában: obligát aerobok diff. diagnosztikája
- **végrehajtás:**
 - tárgylemezre szűrőpapír darabkát
 - oxidáz reagenst rácseppenteni
(= parafenilén-diamin származék)
 - baktériumot rákenni
 - **pozitivitás:** rózsaszín / lila szín



Indol teszt

- triptofán → indol (triptofanáz enzim)
- amidalkoholos (=szerves) oldószer → indol ide átoldódik → vörös gyűrű a tetején (alkohol könnyebb a víznél!)
- ureum-indol csőben is elvégezhető

Indol +: *E. coli*



Indoltermelés kimutatása:

a peptonvizes baktériumtenyészetet amidalkoholban oldott sósavas paradimetil-amino-benzaldehiddel összerázva pozitív esetben az amidalkoholos fázis élénk vörös színű lesz

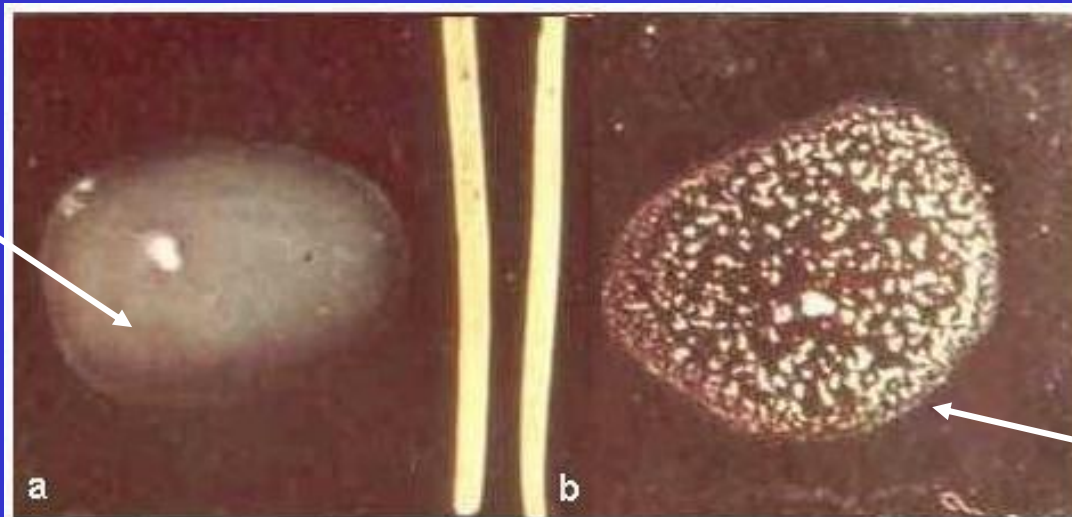
1. kontroll
2. negatív (*Klebsiella*)
3. pozitív (*E. coli*)

6. Tárgylemez agglutináció *E. coli*-val

NEGATÍV

POZITÍV

Baktérium
szuszpenzió
(- kontroll)



Tárgylemez agglutináció (szerotipizálás, kvalitatív reakció, a: negatív, b: pozitív, rögös kicsapódás)

Fehér
rögök,
feltisztult
oldat