

1.4.4. Dezinficiálás

A dezinficiálási eljárásokat a behatás minősége alapján a sterilizáláshoz hasonlóan csoportosíthatjuk:

- Fizikai behatáson alapuló eljárások
 - Hőhatás
 - Kifőzés
 - Áramló vízgőz (Arnold-készülék)
 - Pasztörizálás
 - Tyndallozás
 - Sugárzás
 - UV-sugárzás
- Kémiai hatások: fertőtlenítőszeresek
 - Detergensek
 - Alkoholok
 - Fenoltartalmú szerek
 - Savak és lúgok
 - Nehézfémek
 - Oxidálószeresek
 - Alkilálószeresek

1.6. Molekuláris módszerek a mikrobiológiában

1.6.1. Nukleinsav kimutatási módszerek

A nukleinsavak (DNS, RNS) molekuláris biológiai módszerekkel történő kimutatását elsősorban azokban az esetekben alkalmazzuk a mikrobiológiai diagnosztikában, amikor a kórokozó kimutatása a klasszikus módszerekkel (tenyésztés, mikroszkópos kimutatás) nehéz, vagy egyáltalán nem lehetséges. Ezenkívül fontos kiegészítésül szolgálhatnak a klasszikus módszerek mellett, illetve bizonyos speciális esetekben is szükségünk lehet ezekre a módszerekre. Előnyük a nagyfokú szenzitivitás és specifitás, a viszonylagos olcsóság; hátrányuk viszont az esetleges (akár minimális) kontaminációból adódó álpozitivitás, valamint az a tény, hogy magát a kórokozót tartalmazó minta szükséges hozzá (ellentétben pl. az antitest kimutatással).

A nukleinsav kimutatási módszerek legfontosabb **felhasználási területei:**

- a kórokozó táptalajon nem tenyészthető (pl. vírusok, obligát intracelluláris baktériumok),
- a kórokozó rutin körülmények között nehezen tenyészthető (pl. *Brucella* fajok, mikroaerofil vagy obligát anaerob baktériumok),
- a kórokozó tenyésztése időigényes (pl. *Mycobacterium*ok),
- a kórokozót gazdag kísérőflóra közül kell kimutatni (pl. *Neisseria meningitidis* torokmintából),
- a betegség súlyossága miatt gyors diagnózisra van szükség (pl. meningitis vagy szepszis gyanúja esetén),
- a kórokozó izolálása/tenyésztése különösen nagy fertőzési kockázatot jelent (pl. *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, Rickettsiák, dimorf gombák),
- fontos az igen érzékeny kimutatás (pl. HPV high-risk vagy low-risk típusok),
- járványtani szempontból kiemelt jelentőségű rezisztens törzsek kimutatása (pl. MRSA-, ESBL-szűrés),
- rezisztenciagének kimutatása (pl. vanA, vanB: vancomycin rezisztenciáért felelős gének),
- virulenciagének kimutatása (pl. *S. aureus* enterotoxinok).

Az identifikálási céllal alkalmazott nukleinsav-kimutatási módszerek lényege, hogy minden kórokozóban találunk olyan DNS-szakaszokat, amelyek kizárólag az adott fajban találhatók meg, ezért az ezekre tervezett primerek / próbák használata alkalmas a fajszintű azonosításra.

1.6.1.1. Amplifikáción alapuló módszerek

PCR (polymerase chain reaction)

A PCR lényege, hogy egy jól kiválasztott, egyedi DNS szakaszt annyira fölsokszorosít **(amplifikál)**, hogy az már agaróz gél elektroforézissel és nukleinsav festéssel könnyen kimutatható legyen.

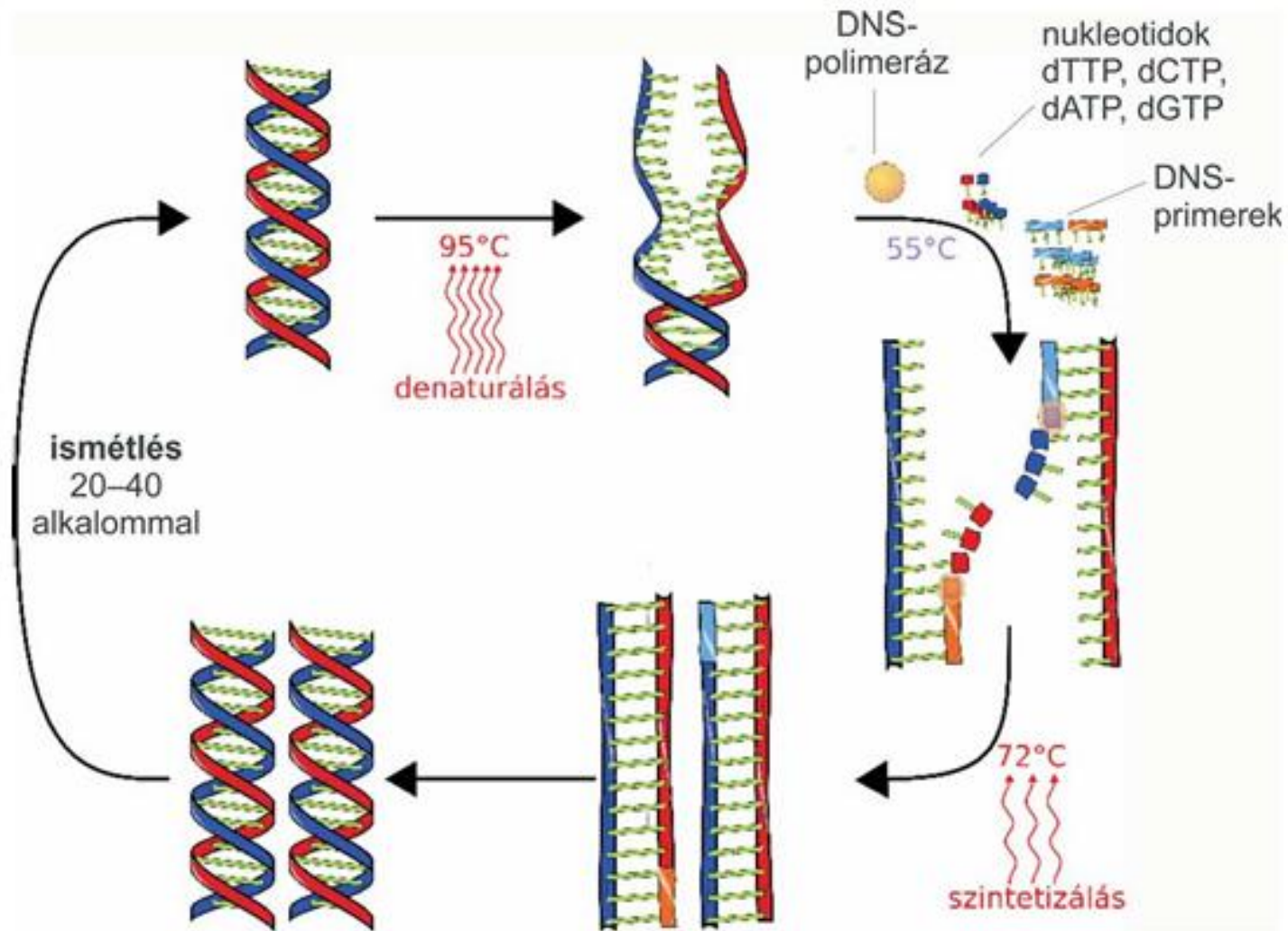
- A keresett DNS szakaszra rövid, 20-30 nukleotidos
- Homológ
- DNS darabkákat tervezünk
- Ezek a primerek
- Mindkét DNS szálra egyet: primer párok

- Ezek az oldatban levő DNS-hez kötődve
- Termostabil polimeráz segítségével
- A homológ szál felépítését eredményezik

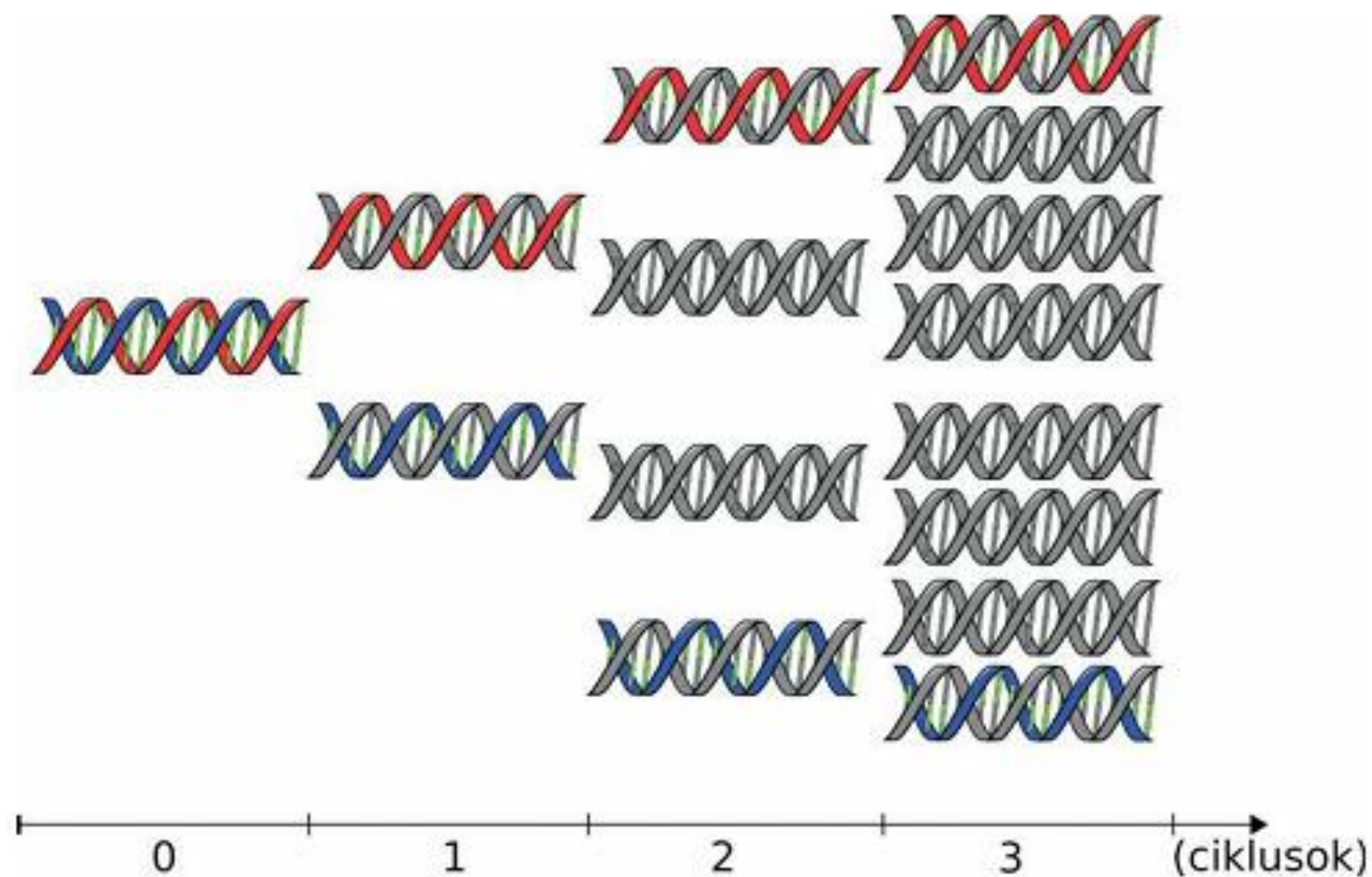
- Az amplifikáció ismétlődő ciklusokon (30-40

kör) keresztül történik (1.30. ábra). Minden ciklus három lépésből áll, amelyek egyenként 30–60 másodperc hosszúságúak:

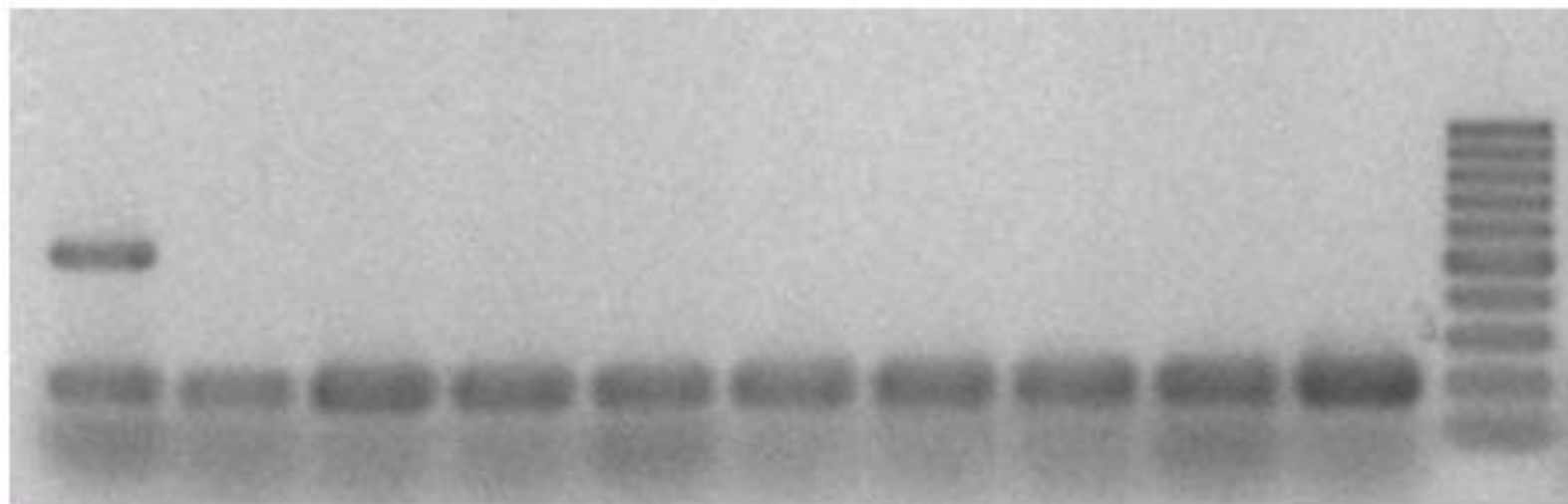
1. a kettős DNS-szál szétválása magas hőmérséklet hatására (denaturációs lépés, tipikusan 94–95 °C-on),
2. a specifikus primerek bekötődése a homológ szakaszhoz („annealing” lépés, jellemzően 50–60 °C között),
3. a komplementer DNS-szál szintézise (meghosszabbítása) a primerekből kiindulva, thermostabil polimeráz enzim segítségével (elongációs lépés, a leggyakrabban használt *Taq*-polimeráz 72 °C-on működik).



1.30. ábra. A PCR lépései sematikus ábrázolásban



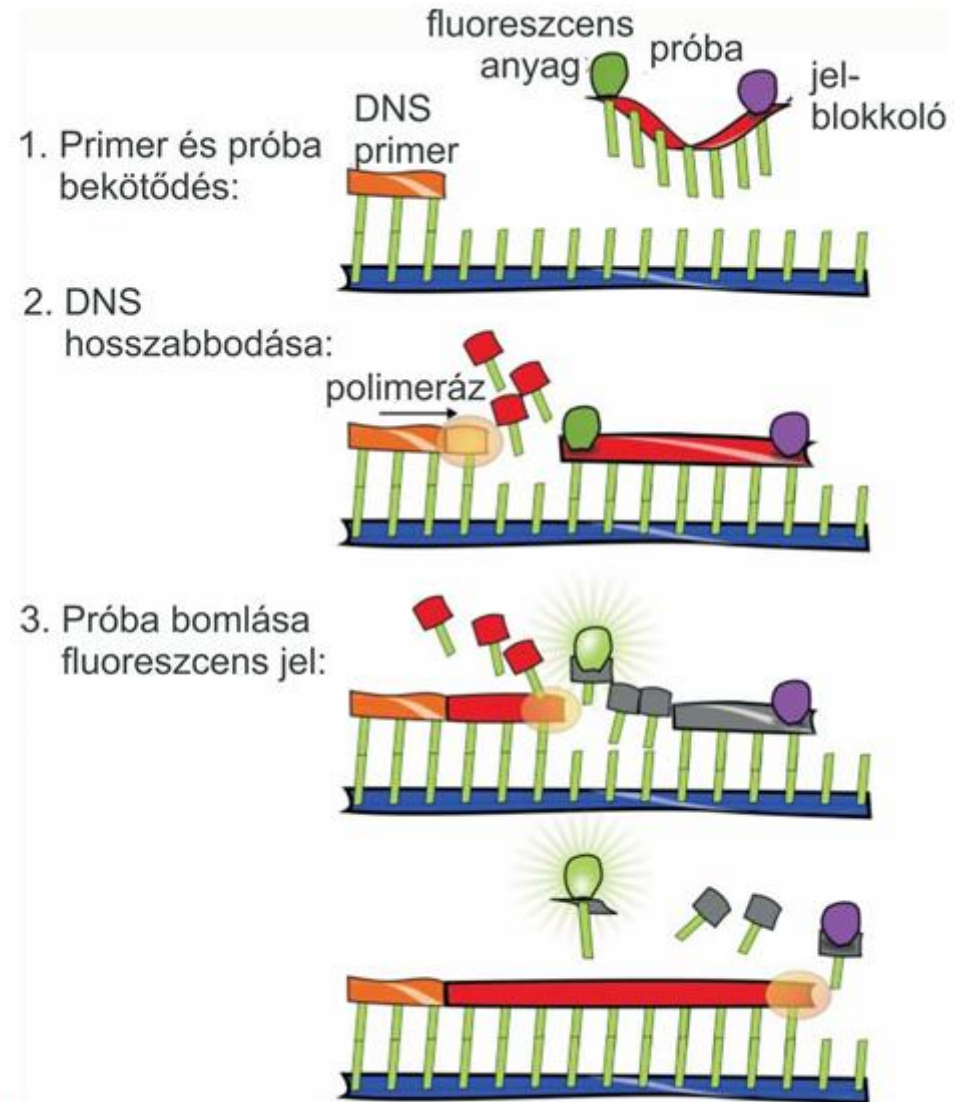
1.29. ábra. A PCR során a kívánt DNS-szakasz mennyisége exponenciálisan nő (piros és kék szálak: eredeti DNS-szakasz, szürke szál: újonnan szintetizált DNS-szakasz)



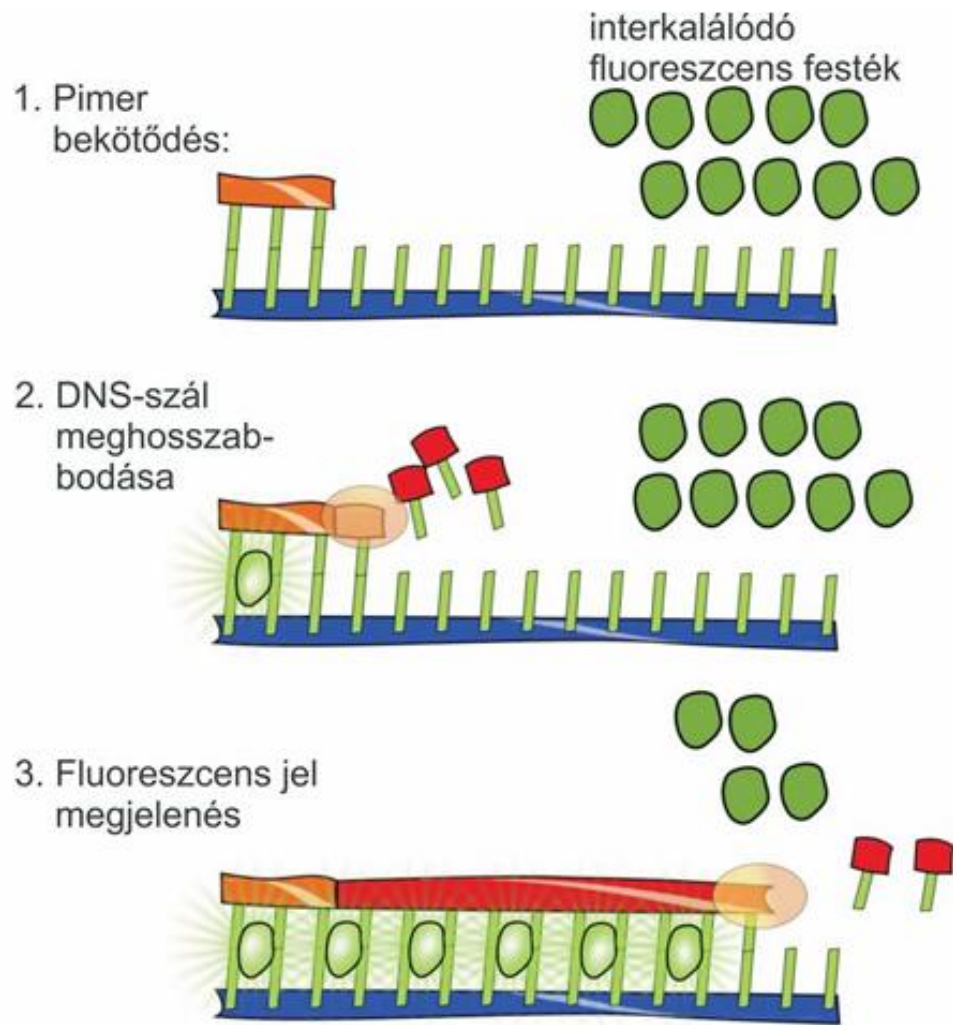
1.31. ábra. MRSA szűrés PCR-rel [első minta: methicillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) törzs, további minták: methicillin-érzékeny *S. aureus* (MSSA) törzsek, utolsó minta: molekulásúly marker]

Real-time PCR (qPCR)

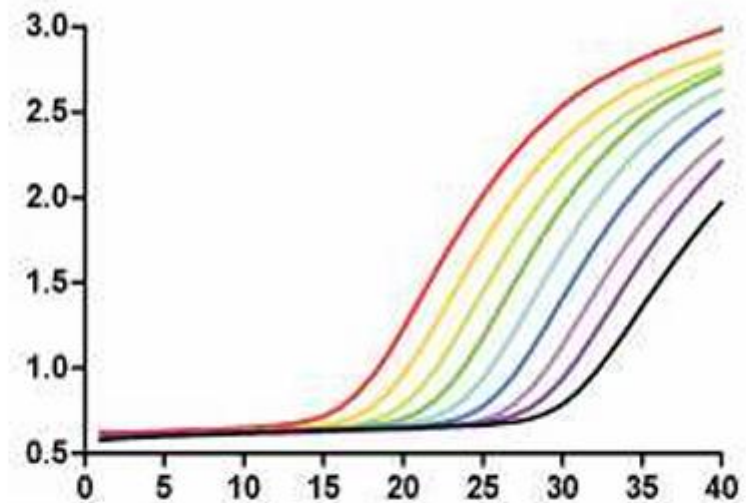
A real-time PCR vagy qPCR az amplifikációt és a detektálást egy lépésben végzi el, kikerülve ezzel a minták agaróz gélben való futtatását. Ebben az esetben a primer páron kívül fluoreszcens festékek is szerepelnek a reakcióban, amelyek jeladását valós időben követi a qPCR-berendezés az exponenciális amplifikáció során, ezáltal precíz kvantitatív detektálást téve lehetővé.



1.32. ábra. A TaqMan qPCR sematikus vázlata



[.33. ábra.](#) A SYBR Green qPCR sematikus vázlata



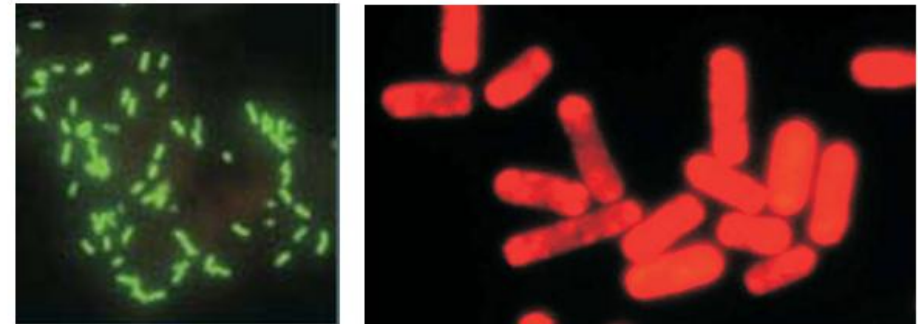
[1.34. ábra.](#) qPCR standard görbe

1.6.1.2. Nukleinsav próbák-hibridizációs módszerek

Hibridizáció során szintén egy adott fajra specifikus génszekvenciát választunk ki, de ebben az esetben nem ennek amplifikációja történik, hanem egy **jelzett** komplementer DNS-szakasz, az ún. **hibridizációs próba** segítségével mutatjuk ki a kérdéses szakasz jelenlétét.

Radioaktív
Enzimatis
Biotin/avidin
fluoreszcens

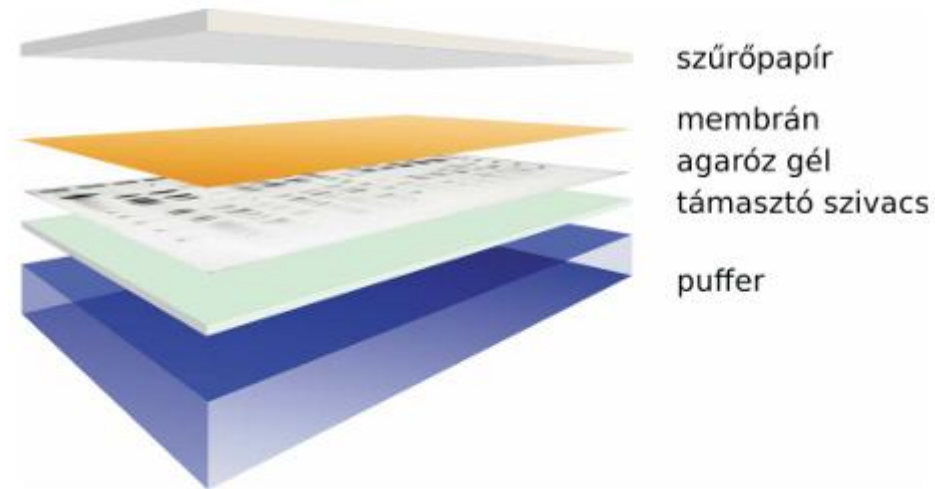
Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)



[1.35. ábra.](#) Baktériumok kimutatása FISH technika segítségével

Blottolásos technikák

Első lépésként a restriktív enzimmel megemésztett DNs-templátot agarózgélben elektroforetikusán szétválasztjuk, majd a gélről a számos nukleinsav-darabkát egy nitrocellulóz- vagy nejlónmembránra „blottoljuk”, azaz diffúzióval átvisszük és ott rögzítjük, mintegy lenyomat készítünk róla (1.36. ábra). Erre azért van szükség, mert a gél törékenysége miatt nehezen kezelhető. Ezen a membránon hajtható végre aztán a denaturáció, a próbák hibridizálása és végül a detektálás is.



1.36. ábra. A blottolásos technika

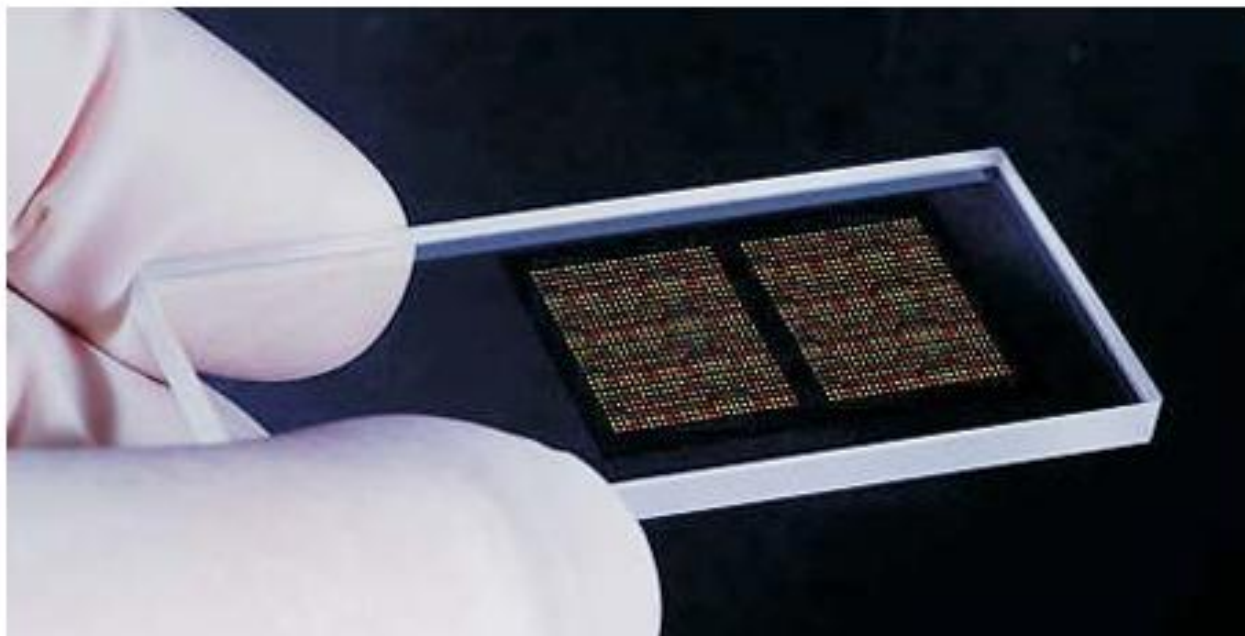
DNS kimutatása: Southern blot

RNS kimutatása: Northern blot

Fehérje kimutatása: Western blot

DNS-chip (microarray) technika

Ezzel a módszerrel egy mintából egyszerre akár több tízezernyi próba segítségével kereshetünk specifikus DNS-szakaszokat. Természetesen ennek megfelelően itt a próbákat rögzítjük szilárd felületre, ami általában egy tárgylemez méretű üveglap, így jön létre a DNS-chip (1.37. ábra). Mivel ennyiféle különböző jelölést nem lehet alkalmazni, itt magát a mintát jelölik fluoreszcens festékekkel. Amennyiben a mintában jelen volt valamilyik keresett szakasz, úgy a pozitivitás UV mikroszkóp alatt detektálható.



1.37. ábra. DNS-chipek

Felhasználása:

azonosítás (pathogéneké pl)

genotipizálás

génexpressziós profil meghatározása

rezisztenciakimutatás

1.7. Baktériumok tipizálására használt módszerek

1.7.1. Fenotipizáló módszerek

1.7.1.1. Fágtypizálás

Mivel a bakteriofágok a baktériumok vírusai, olyan forrásokból mutathatók ki, ahol nagy mennyiségű baktérium fordul elő (pl. emberi vagy állati ürülékből, szennyvízből, talajból stb.). Minden fág csak bizonyos baktériumféleségekben találja meg létfeltételét, és ez az affinitás annyira receptor-specifikus, hogy segítségével egyes baktérium fajokon belül jól elkülönülő **fágtípusok** mutathatók ki.

Lízissel – „tarfoltok”

S. aureus, E coli,
Salmonella (pl MRSA)

1.7.1.2. Szerotipizálás

Sejtfelszíni bakteriális antigének (O,K,H)
specifikus antitestekkel
(protektív antigének)

Tok antigének legtöbbször

Neisseria meningitidis (12)

Streptococcus pneumoniae (90)

Haemophilus influenzae (6 féle szerotípus)

STEC – Shiga Toxin E-coli (O157)

HUS (hemolitikus urémiás) EC – O104 (STEC)

Sejthez kötött antigénekről lévén szó, a szerotipizálás gyakorlati megvalósítása rendszerint tárgylemez agglutináció (elsősorban **latex agglutináció**) formájában történik. A pneumococcus esetében az ún. *Neufeld*-féle **tokduzzadási próba** (*Quellung*-reakció) a referencia módszer, melynek során a specifikus antitestek jelenlétében a tok megduzzad, és ez mikroszkóp alatt nézve egy haló megjelenését eredményezi a baktériumsejt körül (**1.38. ábra**). A *Streptococcus*ok közül a *S. agalactiae* is többféle tok típussal rendelkezik, míg a *S. pyogenes* is tokos, de a tokja szerológiailag egységes. Szintén a *Streptococcus*okhoz kapcsolódó szerotipizálási reakció tulajdonképpen a *Lancefield*-tipizálás is, amely azonban kivételesen nem fajon belüli, hanem genuson belüli megkülönböztetésre használatos egy sejttel polisacharid alapján.



1.38. ábra. Tokduzzadási reakció pozitív eredménye
(*Dr. Tirczka Tamás* felvétele)

1.7.2. Fontosabb genotipizáló módszerek

A baktériumok genotípusos (azaz DNS-szintű) vizsgálatának legbiztosabb módszere a teljes genetikai állomány (genom) szekvenálása (whole genome sequencing, WGS) lenne. Ez ma már a kutatás számára nem elérhető, azonban a mindennapi gyakorlatban még túl költséges módszernek számít. Ennek kiváltására használatosak az alábbiakban ismertetett eljárások.

1.7.2.1. Szekvencia alapú módszerek

Multilocus sequence typing (MLST)

A teljes baktérium genom szekvenálása helyett itt csupán néhány (rendszerint hét), jól kiválasztott ún. „háztartási” gén 400–500 bp nagyságú fragmentumának szekvenálása történik meg.

Létfontosságú gének

enzimek

MLST honlapok

1.7.2.2. Fragment-alapú („band-based”) módszerek

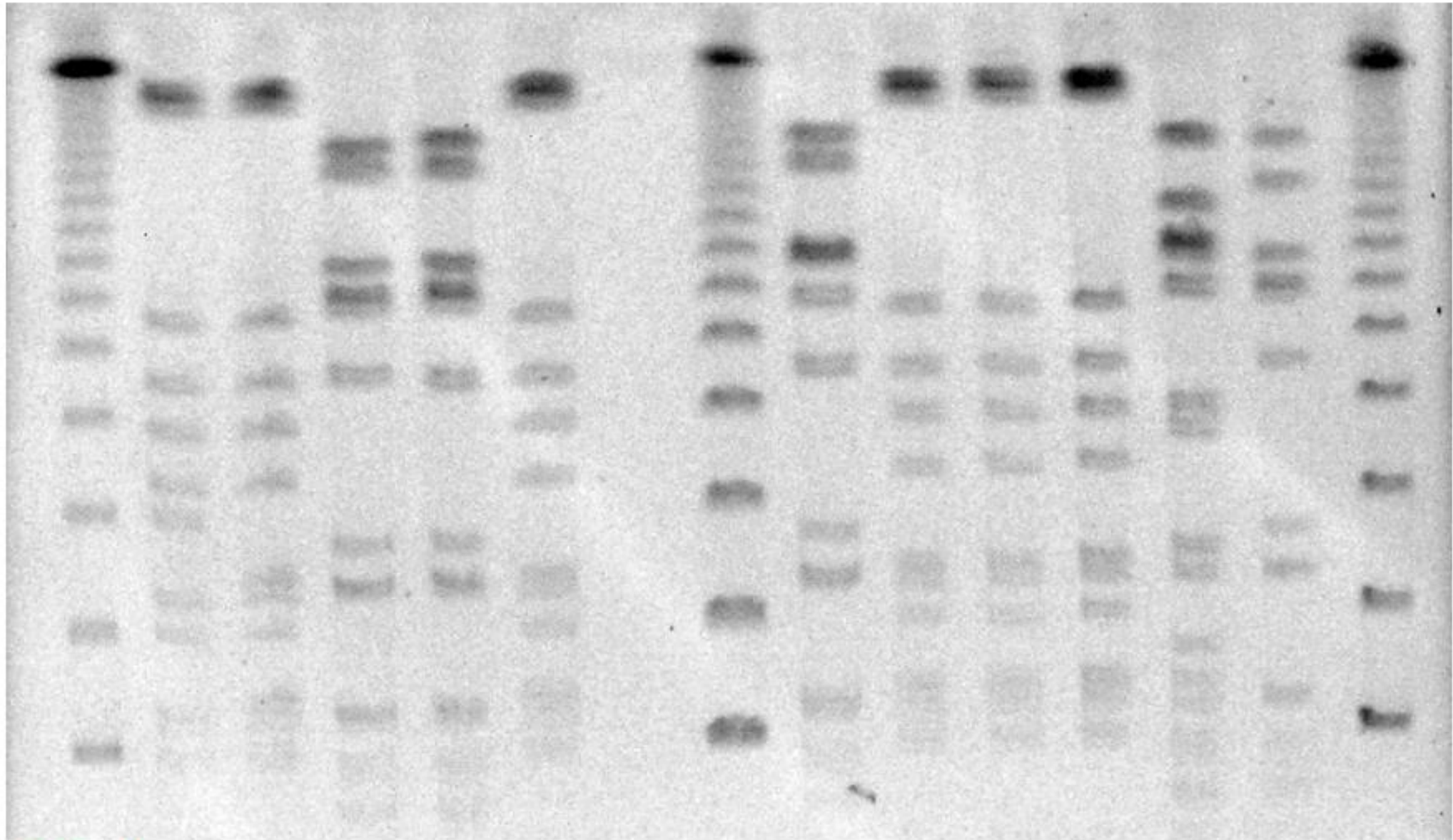
Pulsed-field gélelektroforézis (PFGE)

Az MLST mellett a PFGE az egyik leggyakrabban alkalmazott genotipizálási módszer a bakteriológiában. A teljes baktérium genomot speciális, kevés hasítóhellyel rendelkező restriktív enzimmel (pl. *Sma*I melynek hasító helye: GGG/CCC) emésztjük és a kapott fragmentumokat agaróz gélen megfuttatva vizualizáljuk

A szokásos fél-egy óra helyett 21-24 óra a szeparálás időtartama



1.40. ábra. PFGE készülék futtatókádja (középen a géllal) a körben elhelyezkedő elektrodokkal, amelyek lehetővé teszik a váltakozó irányú áram létrejöttét



1.39. ábra. PFGE gélkép (a gél két oldalán és középen molekulásúly marker látható)

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

Ribotipizálás

A bakteriális riboszomális operon három rRNS molekulából áll: a 16S, 23S és 5S rRNS-ből. Mivel az rRNS-eknek alapvető szerepük van a fehérjeszintézisben, ezért rendkívül konzervált molekulák, de közülük is a 16S rRNS a legstabilabb, ezért rendszerint ez a ribotipizálás célpontja. Az előzetesen restrikciós enzimmel (pl. *EcoRI*) hasított genomiális DNS-fragmentumait agarózgélen szeparálva, majd membránra blottolás után 16S rRNS-specifikus hibridizációs próbákkal reagáltatva az egyes izolátumok esetében más-más mintázatot kapunk.

Nozokomiális és iatrogén fertőzések

Nozokomiális – kórházban szerzett

Iatrogén – az orvosi beavatkozás (diagnosztikus vagy terápiás) során történő fertőzés

A kórokozók rendszerint multirezisztensek
Súlyos szövődmények
Kezelési költségek emelkednek

Infekciókontroll
dekontamináció

Nozokomiális és iatrogén fertőzések leggyakoribb kórokozói

- **Baktériumok amelyek kanülön, katéteren, lélegeztetőgépen keresztül fertőzhetnek:** *Staphylococcus aureus*, a koaguláz-negatív *Staphylococcus*ok, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*.
- **Vírusok amelyek transzfúzióval, szervtranszplantációval terjedhetnek:** Epstein–Barr-vírus, cytomegalovírus, hepatitis-B-, hepatitis-C-vírus, HIV, TTV.
- **Gomba, ami kanülön, katéteren keresztül terjedhet:** *Candida* spp.

Húgyúti – E. coli, K. (Klebsiella) pneumoniae, Proteus, Enterobacteriales, Pseudomonas spp.,
gombák

Nozokomiális sebfertőzések – S aureus, MRSA, P aeruginosa, Enterococcus, E. coli, K.
pneumoniae

Nozokomiális pneumonia – 15-20% !!

lélegeztetőgép

P aeruginosa

S aureus, MRSA

Enterobacter

Klebsiella

E coli

Haemophilus influenzae

Serratia marcescens

Streptococcus pneumoniae

anaerob baktériumok, gombák

Legionella spp

Acinetobacter baumannii

Nozokomiális véráram fertőzések

Nozokomiális véráram fertőzéseknel megkülönböztetünk bakteriológiai vizsgálattal igazolt véráram fertőzést és szepszis szindrómát. Ezen fertőzés esetén jellegzetes hajlamosító tényezők a centrális vénás katéter és a kanül. Nozokomiális véráramfertőzések incidenciája, a kórokozók spektruma különösen függ a klinikai osztály jellegétől, a meglévő és kialakuló predisponáló tényezőktől. Mindent összevetve az átlagos előfordulás 7–8%-ra tehető. A véráramfertőzés diagnosztizálásához elengedhetetlen, hogy hemokultúrát kell venni, így lehet mikrobiológiailag alátámasztani a diagnózist.

A nozokomiális véráram fertőzés kórokozói jellemzően a *S. aureus*, koaguláz-negatív Staphylococcusok, Enterococcusok, *Candida albicans*, a Gram-negatív anaerob baktériumok, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, az *Acinetobacter spp.*

Minden kórokozó faj esetében jellemző a multirezisztens törzsek számának emelkedése.

5. Nozokomialis enteralis fertőzések

Az enteralisan terjedő nozokomiális bakteriális fertőzések közül kiemelendő a *Clostridium difficile* okozta **pseudomembranosus colitis**.

A fertőzés patomechanizmusában központi szerepet játszik az emésztőrendszerben kis csíraszámú jelen lévő vagy spóra formában bejutó *C. difficile*, amely a nagyszámú normálflóra baktérium jelenlétében inaktív marad. Azonban a széles spektrumú antibiotikumkezelés hatására a normális bélflóra baktériumai száma olyan mértékben lecsökken, hogy az eddig inaktív *C. difficile* elszaporodik és a toxin termelés (enterotoxin, citotoxin, binary toxin) következtében hasmenést és lokális gyulladást okoz a vastagbélben, ami véres széklet ürítéssel jelentkezik. Ezen fertőzés kezelésére hatásos eljárás a széklet transzplantáció

1.9. Laboratóriumi állatok a mikrobiológiában

Az orvostudomány számos területén van szükség laboratóriumi állatok alkalmazására *in vivo* vizsgálatok céljából.

Kísérleti állatok használata szigorú **szabályozás** alatt áll, csak engedéllyel végezhető. Ezeket a következő rendelkezések szabályozzák: 40/2013. (II.14.) Kormányrendelet az állatkísérletekről, az 1998. évi XXVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről, a 2010/63/EU irányelv a tudományos célra használt állatok védelméről, a Semmelweis Egyetemen pedig az érvényes a 2017. évi Állatkísérleti szabályzat.

Állatokat az emberiség számos céllal tart és használ fel. Táplálkozásra szolgál az összes felhasznált állat több, mint 95 %-a, míg tudományos kutatás céljára ezek körülbelül 0,3%-a.

Az állati **in vivo modellek** számos területen voltak nélkülözhetetlenek az emberi szervezet működésének megértésében, új terápiás és megelőzési lehetőségek létrehozásában, így például a diftéria elleni védőoltás kifejlesztésében, a veszettség kezelésében, minimálisan invazív sebészeti technikák kidolgozásában stb.

Állatkísérletek tervezésekor a 3 R alapelvét kell szem előtt tartani: *refinement*: a kísérletben részt vevő állatok fájdalmának és szenvedésének csökkentése, *reduction*: az állatkísérletben részt vevő állatok számának lehetőség szerinti csökkentése és a *replacement*: az állati modellek helyettesítése más modellel.

A leggyakrabban használt **kísérleti állatok** az egér, patkány, nyúl, csirke és a tengerimalac. Az egyes fajok és az ember között jelentős eltérések lehetnek, ezek figyelembe vételével kell kiválasztani a vizsgálathoz felhasznált modellt, hogy a kapott eredmények az emberre extrapolálhatóak legyenek.



1.41. ábra. A laboratóriumi állatoknak emléket állító szobor az Orosz Tudományos Akadémiai Genetikai és Citológiai Intézete előtt, Novoszibirszkben, Oroszországban



1.42. ábra. Laboratóriumi egér

1. Mikroorganizmusok kimutatása állatoltással

A mikrobiológiai diagnosztikus módszerek fejlődése ellenére még mindig van néhány kórokozó, amelyek *in vitro* táptalajokon nem tenyészthetők. Ezeket a mikrobákat **diagnosztikus vagy kutatási céllal** fogékony állatban lehet oltani, hatásaikat vizsgálni, a törzseket fenntartani. Ilyen például a syphilit okozó *Treponema pallidum*, amely nyúlherében tartható fenn, a lepra kórokozója a *Mycobacterium leprae*, amelyet armadillóba oltanak, vagy a *Coxsackie* vírusok, amelyek A és B típusának elkülönítése szopós egerek beoltásával történik.

Újjonnan felfedezett mikrobák és az általuk feltételezhetően okozott megbetegedések közötti kapcsolat a **Koch-posztulátumokban** leírt vizsgálatokkal igazolható. Ezekhez is szükség van a mikrobára fogékony laboratóriumi állat oltására.

A kórokozók **virulenciáját**, megbetegítőképességüknek erősségét is állatoltással jellemezhetjük. ID₅₀ (infectious dose 50) az a kórokozómennyiség, amely a beoltott állatok felét megbetegíti, LD₅₀ (lethal dose 50) az a mikrobamennyiség testtömeggrammonként, amely az állatok felét elpusztítja. A mikrobák között jelentős eltérések vannak virulenciájukban. Salmonellák esetében például nagy csíraszámú, >10⁵ baktérium elfogyasztása esetén alakul ki megbetegedés az emberben, míg Shigellákból már néhány 10 is képes betegséget kiváltani.

Influenza**vakcina gyártásához** a vírust embrionált csirketojásba oltva szaporítják.

2. **Antitestek termelése**

Adott kórokozó antigénjeire specifikus antitesteket is állatokban állítanak elő. Ezeket az ellenanyagokat felhasználják egyrészt a **diagnosztikus szerológiai tesztek** gyártásában.

Másrészt számos toxin mediálta bakteriális megbetegedés **terápiájára** az egyetlen lehetőség, hogy a betegnek a keringő toxinokat megkötő és semlegesítő, neutralizáló antitoxint (toxin ellenes immunglobulint) adnak be.

3. Toxinok kimutatása, értékmérése

Diagnosztikus céllal szükség lehet arra, hogy beteg véréből igazoljuk bakteriális toxin jelenlétét. Ennek egyik módja, hogy a beteg savóját a kérdéses toxinra fogékony állatnak adják be. Amennyiben az állat a toxinra specifikus tüneteket mutat, esetleg elpusztul, igazolható a toxin jelenléte a betegben. Például szükség lehet erre a botulizmus és más petyhüdt bénulással járó állapotok elkülönítésében.

Toxinok **értékmérése** során azok erősségét határozzák meg. Felhasználható arra, hogy toxin mennyiségét állapítsák meg egy mintából. Egységei a *dosis letalis minima* (DLM), az a legkisebb toxin mennyiség, amely 250 g súlyú tengerimalacoknak beadva 4 nap alatt az állatok 75%-át elpusztítja; illetve a *dosis letalis certa* (DLC), azaz a legkisebb toxinmennyiség, amely a fenti módon beadva az összes állatot biztosan elpusztítja. Antitoxinok mennyiségének mértékegysége az AE, az antitoxin egység, amely 100 DLM toxinnal szemben megvédi az állatot.

4. **Ártalmatlansági vizsgálatok**

Gyógyszerek és védőoltások kórokozó-mentességét és toxicitásuk hiányát is állatoltással lehet igazolni. Intravénás felhasználásra szánt készítmények esetében a szernek nemcsak sterilnek, de pirogénmentesnek is kell lennie. Ennek ellenőrzésére szolgál a LAL-teszt, amely kivitelezéséhez antlanti törfarkú rák vérét használják fel. (részletesebben lásd →1.4.3.7. fejezet: *Pirogenitás vizsgálat, LAL teszt*)

5. **Állatkísérletek a kutatásban**

Míg a diagnosztikus célú állatoltások a szerológiai és molekuláris módszerek fejlődésével egyre inkább háttérbe szorulnak, a kutatás területén a jövőben is szükségük az állatkísérletek. Összetett *in vivo* folyamatok, mint a szepszis és az azt befolyásoló gyógyszerek kutatásához például nélkülözhetetlen, hogy a vizsgálatokat ne csak *in vitro*, hanem **élő szervezetben modellezve** is elvégezzék.

Állatkísérletek kell, hogy megelőzzék minden **új gyógyszer és terápiás beavatkozás** embereken történő kipróbálását, az embereken folyó orvosi kutatásokat szabályozó *Helsinki nyilatkozat* alapelvei szerint.