

Biokémiai vizsgálatok

Készítette:

Dr. Kovács Krisztina

Dr. Melegh Szilvia

2015

Tartalomjegyzék

<u>I. Alapelvek</u>	<u>04</u>
<u>II. Hagyományos biokémiai vizsgálatok</u>	<u>06</u>
<u>a) Egyszerű enzimkimutatás reagens segítségével</u>	
<u>Oxidáz-próba</u>	<u>08</u>
<u>Kataláz-próba</u>	<u>09</u>
<u>b) Egyszerű biokémiai táptalajok</u>	
<u>O/F-próba</u>	<u>10</u>
<u>Metilvörös-próba</u>	<u>12</u>
<u>ONPG-próba</u>	<u>14</u>
<u>Eszkulin-próba</u>	<u>16</u>
<u>Citrát-próba</u>	<u>18</u>
<u>Ureáz-próba</u>	<u>20</u>

Tartalomjegyzék

<u>Indol-próba</u>	<u>22</u>
<u>PAD-próba</u>	<u>24</u>
<u>Aminosav-dekarboxiláz-próba</u>	<u>26</u>
<u>c) Összetett biokémiai táptalajok</u>	
<u>Nógrády-politróp</u>	<u>28</u>
<u>III. Félautomata rendszerek</u>	<u>30</u>
<u>API</u>	<u>31</u>
<u>IV. Automata rendszerek</u>	<u>32</u>
<u>Vitek-2</u>	<u>33</u>
<u>V. Gyakorlat</u>	
<u>1. nap</u>	<u>34</u>
<u>2. nap</u>	<u>36</u>

Alapelvek

- **biokémiai vizsgálatok célja:** a klinikai mintából kitenyésztett baktériumok enzimreakciókon alapuló azonosítása (identifikálása)
- vizsgálatokhoz mindig szintenyészet és különálló telepek szükségesek
- **biokémiai vizsgálati módszerek:**
 - hagyományos biokémiai vizsgálatok
 - félautomata identifikáló rendszerek
 - automata identifikáló rendszerek
- **azonosítás (identifikálás) eredménye:** species és/vagy genus megnevezése

Tartalom

Alapelvek

- a baktérium nevéből/rendszertani helyéből következtethetünk a baktérium:
 - patogenitására, klinikai jelentőségére
 - kórokozó, kontamináció, kolonizáció?
 - mikrobiológiai eredményeket mindig a klinikai tünetek ismeretében szükséges értékelni!
 - természetes (veleszületett) antibiotikum-rezisztenciájára
 - lehetséges szerzett rezisztenciamechanizmusainak körére
 - a baktérium rendszertani helyétől függően kell megválasztani azon antibiotikumok körét, melyekkel szembeni érzékenység meghatározása további vizsgálatokat igényel (ld. „Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok” gyakorlat)

Tartalom

Hagyományos biokémiai vizsgálatok



- **egyszerű enzimkimutatás reagens segítségével**
 - további táptalajban történő inkubációt nem igényel
 - azonnal értékelhető
 - pl. oxidáz, kataláz-próba
- **egyszerű biokémiai táptalajok**
 - egyféle enzimreakció vizsgálata
 - egyféle szubsztrát
 - indikátor: táptalaj része vagy utólagos hozzáadás (előhívás) szükséges
 - pl. O/F, metilvörös, ONPG, eszkuilin, citrát, ureáz, indol, PAD és aminosav-dekarboxiláz próbák

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Hagyományos biokémiai vizsgálatok



- **összetett biokémiai táptalajok (politróp táptalajok)**
 - több enzimreakció egyidejű vizsgálata
 - többféle szubsztrátot tartalmaznak sav-bázis indikátorral együtt
 - pl. Nógrády-politróp
- **identifikáló táblázatok**
 - tartalmazza a biokémiai reakciók adott specierek esetében várható eredményét
 - segítségével történik az azonosítás (identifikálás)
 - Id. Gyakorlat II. nap

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSOÓKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Oxidáz-próba

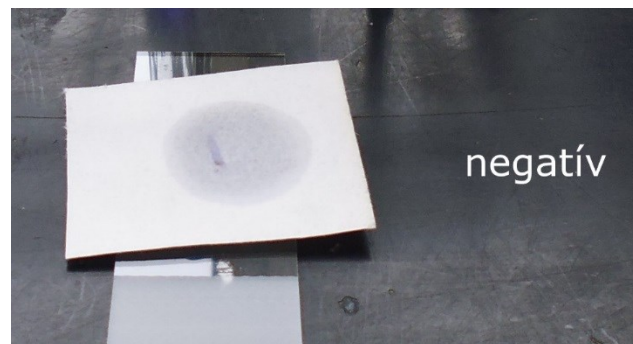
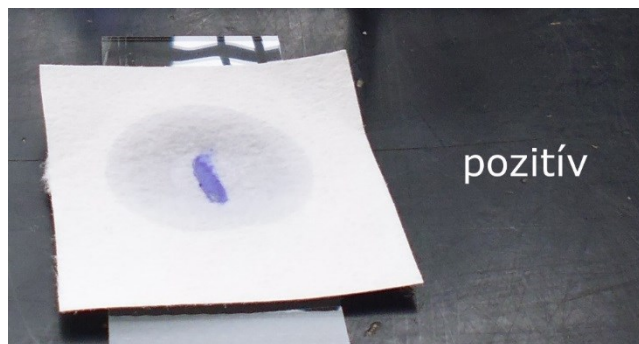
- **vizsgált enzim:** citokróm-oxidáz

oxidált citokróm-C + reagens

citokróm oxidáz

redukált citokróm-C + színes termék

- **próba kivitelezése:** néhány telepnyi baktériumtenyészetet kacs segítségével oxidáz-reagenssel átitatott szűrőpapírra dörzsölünk
- **értékelés:** 10-30 másodpercen belül



[Tartalom](#) [Gyakorlat](#)

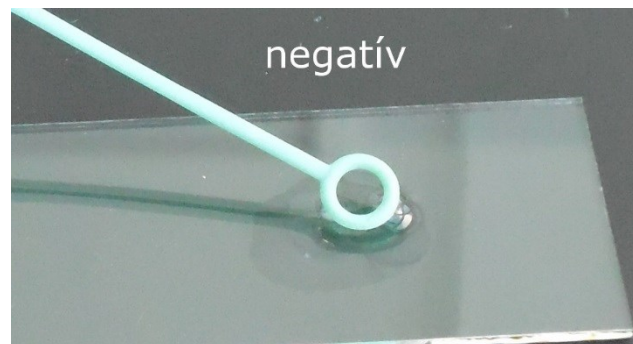
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Kataláz-próba

- vizsgált enzim: kataláz



- **próba kivitelezése:** tárgylemezre 30%-os H_2O_2 oldatot cseppentünk, tárgylemez sarkával vagy kaccsal kevés tenyészetet érintünk a cseppbe
- **értékelés:** azonnal

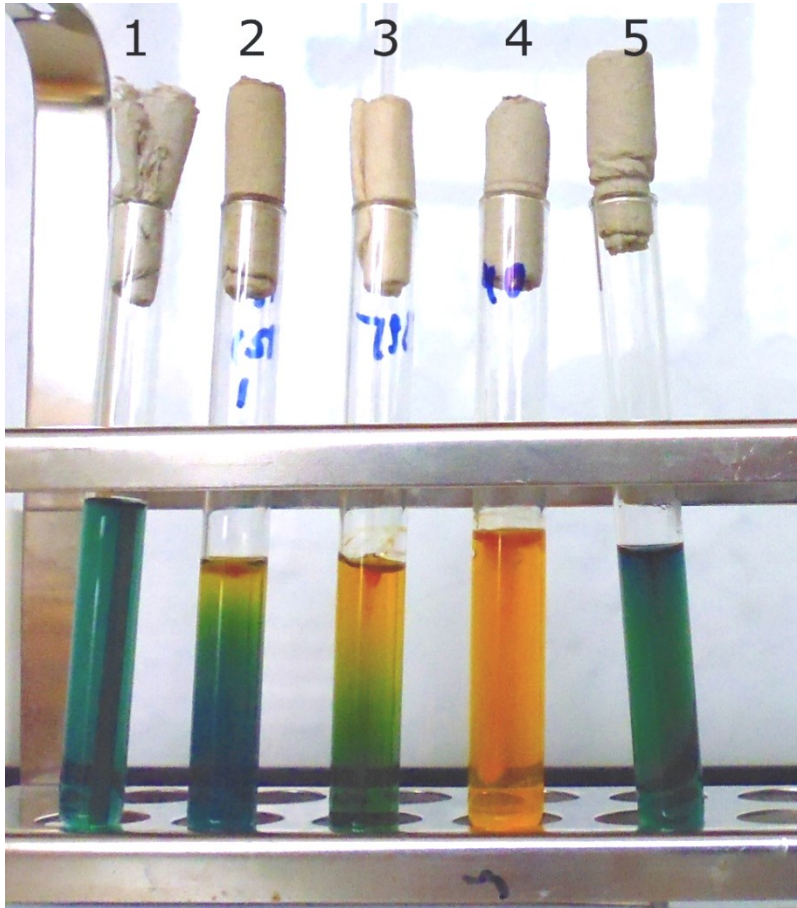


[Tartalom](#) [Gyakorlat](#)

O/F-próba

- **vizsgálat célja:** glükóz bontás típusának meghatározása (Oxidáció/Fermentáció)
- glükóz bontása során sav (pH↓, sárga) vagy lúg (pH↑, kék) keletkezik, melyet indikátor segítségével mutatunk ki
- táptalaj felső része:
aerob → oxidáció
- táptalaj alsó része:
anaerob → fermentáció
- **próba kivitelezés:** tűvel, a cső aljáig beszúrva oltunk be
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

O/F-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. mérsékelt oxidatív savképzés
3. erős oxidatív savképzés
4. fermentatív savképzés
5. alkalizálás

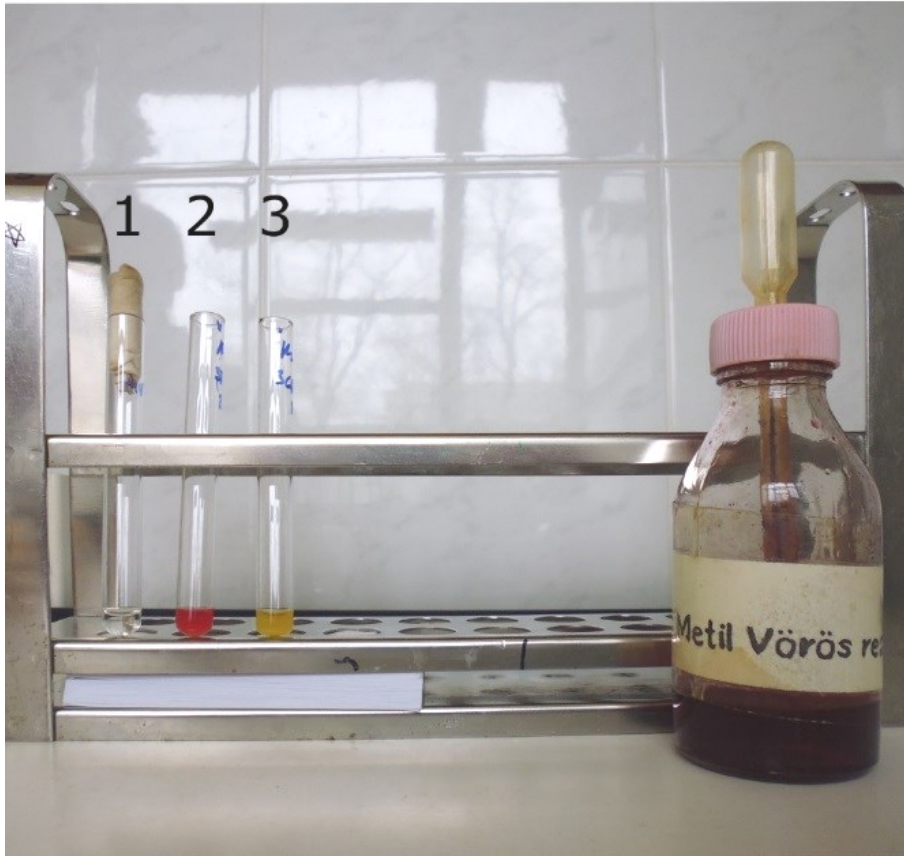
Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Metilvörös-próba

- **vizsgálat célja:** fermentatív glükóz bontás két típusának elkülönítése:
 1. glükózból nagy mennyiségű sav termelése (metilvörös pozitív)
 2. a glükózból keletkezett savak további bontása (metilvörös negatív)
- **próba kivitelezése:** kacsasal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után előhívó oldat (metilvörös reagens) segítségével

Metilvörös-próba



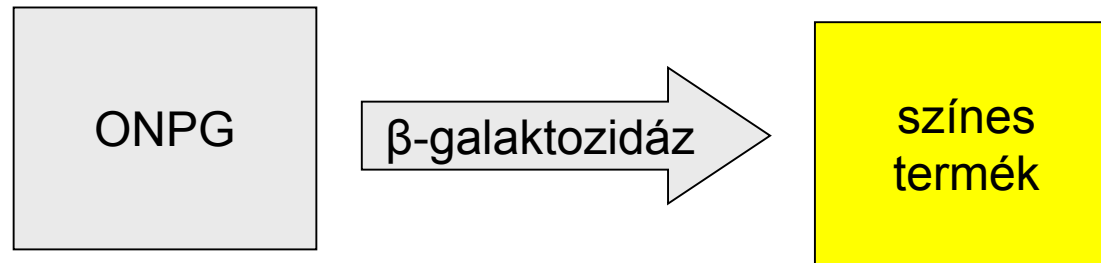
1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

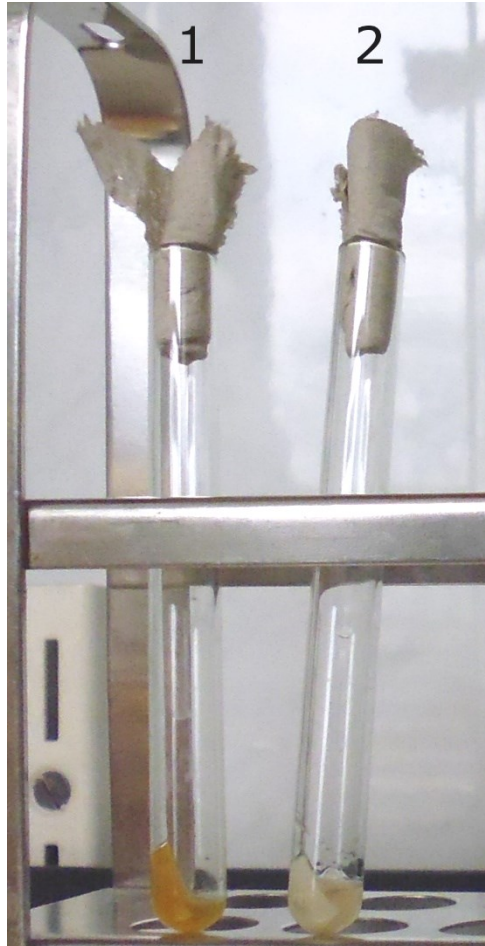
ONPG-próba

- vizsgált enzim: β -galaktozidáz



- **próba kivitelezése:** kevés baktériumtenyészetből steril fiziológias sóoldattal szuszpenziót készítünk, majd abba ONPG-vel átitatott szűrőpapírt helyezünk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

ONPG-próba



1. pozitív

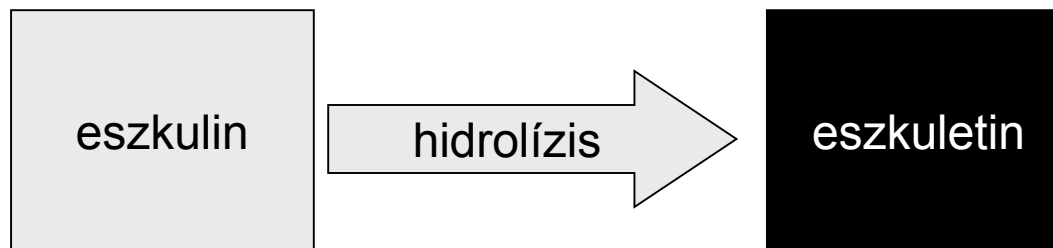
2. negatív

[Tartalom](#) [Identifikáló táblázat](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Eszkulin-próba

- **vizsgálat célja:** eszkulin bontó képesség meghatározás



- **próba kivitelezése:** kacsal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Eszkulin-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

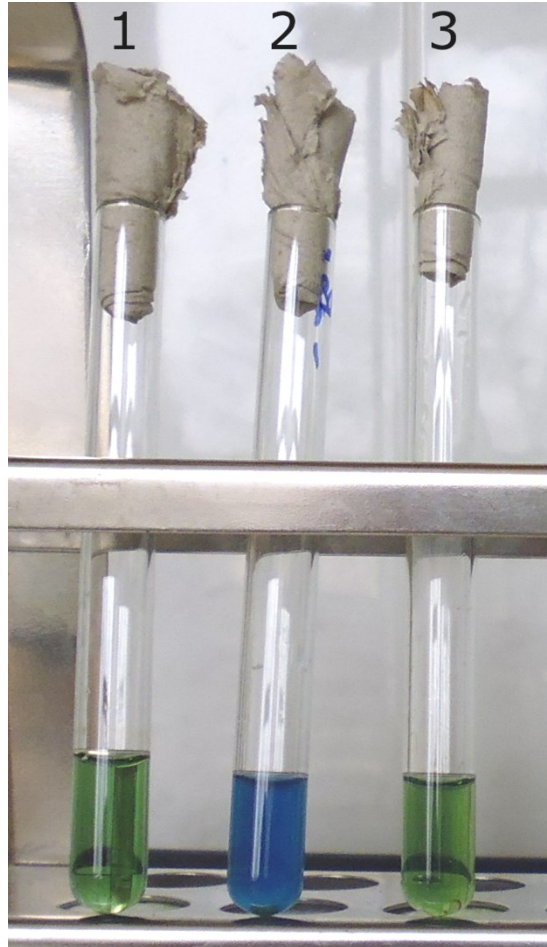
Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSZŐKATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Citrát-próba

- **vizsgálat célja:** citrát felhasználás meghatározása
- **próba kivitelezése:** kacsasal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

Citrát-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

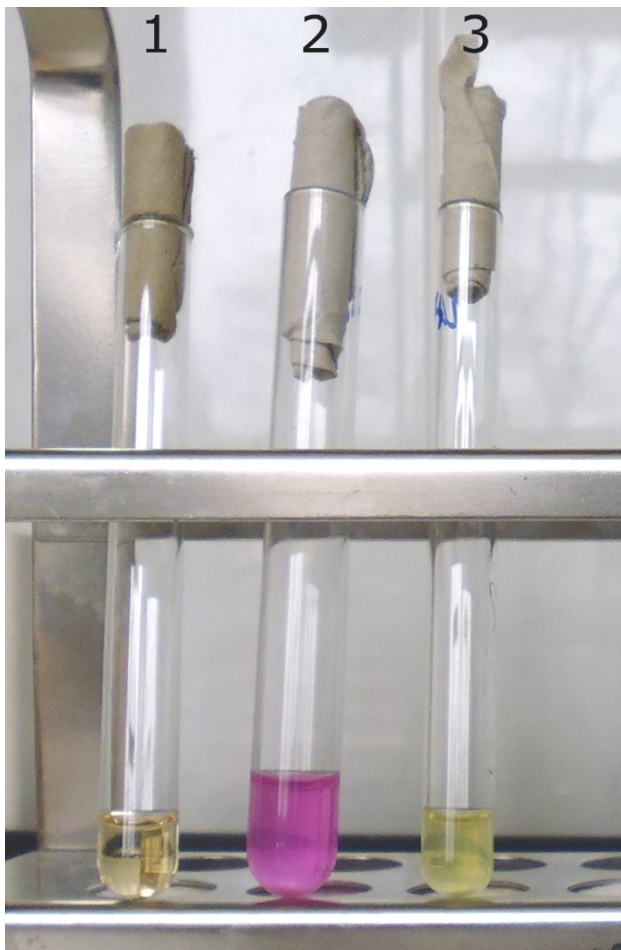
Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Ureáz-próba

- **vizsgálat célja:** ureum bontás (ureáz enzim) meghatározása
- **próba kivitelezése:** kacsal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

Ureáz-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSOŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŐSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Indol-próba

- **vizsgálat célja:** az L-triptofán bontás során keletkező indol kimutatása
- **próba kivitelezése:** kacsasal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után előhívó oldat (Erlich-reagens) segítségével

Indol-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

PAD-próba

- **vizsgálat célja:** a phenylalanin aminosav deaminálásnak kimutatása
- **próba kivitelezése:** kacsasal egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után előhívó oldat (FeCl_3) segítségével

PAD-próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

Tartalom Identifikáló táblázat

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Aminosav-dekarboxiláz- próba



- **vizsgálat célja:** az adott aminosav bontását végző dekarboxiláz enzim kimutatása
- **próba kivitelezése:** tűvel egyetlen telepet az oldatba mártunk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

[Tartalom](#) [Gyakorlat](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

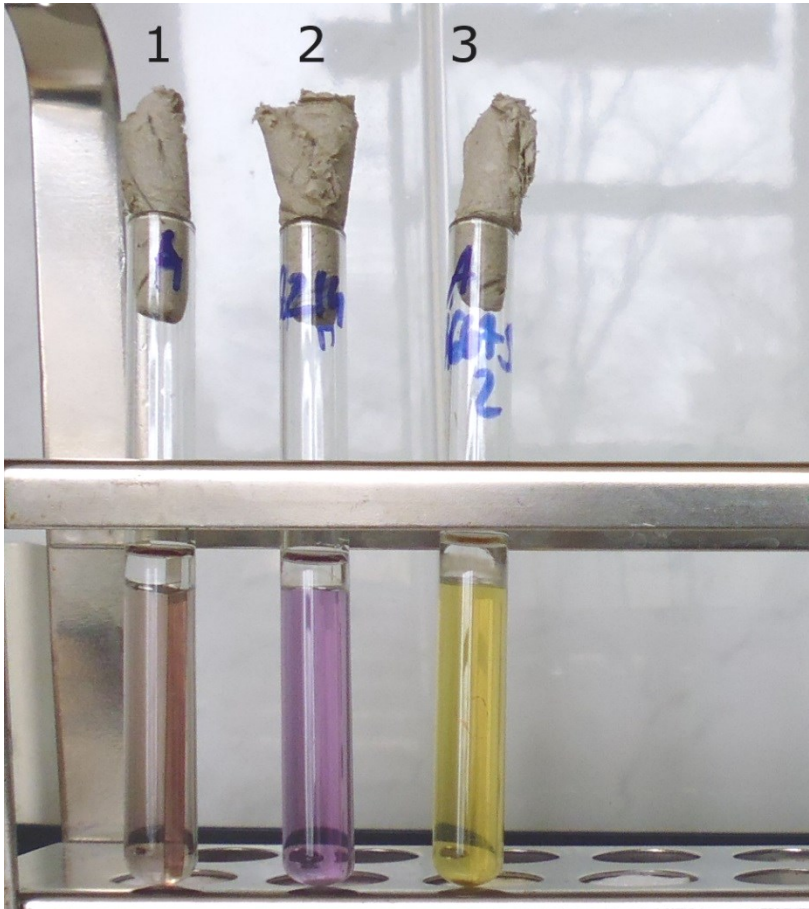
26

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Aminosav-dekarboxiláz- próba



1. beoltatlan táptalaj
2. pozitív
3. negatív

Tartalom Identifikáló táblázat

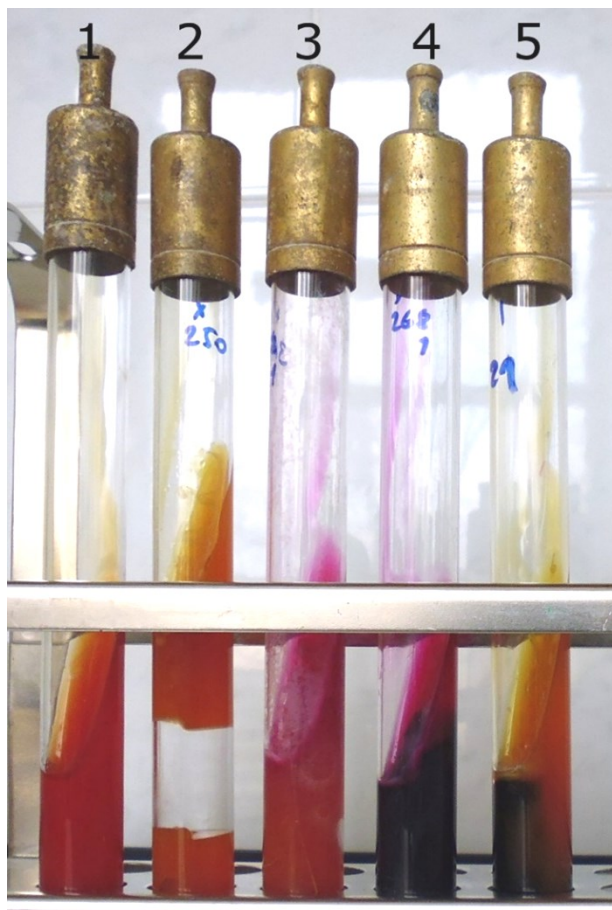
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nógrády-politróp

- összetett biokémiai táptalaj
- laktóz bontás → sav (pH↓, sárga)
- ureum bontás → lúg (pH↑, lila)
- H₂S termelés → FeS (fekete)
- gáztermelés → buborékok

- **próba kivitelezése:** tűvel, a cső aljáig beszúrva oltunk be, majd a ferde rész felszínére szélesztünk
- **értékelés:** 24 óra inkubáció után

Nógrády-politróp



	alsó rész	ferde rész	H ₂ S term.	gáz term.
1.	beoltatlan táptalaj			
2.	sav	sav	-	+
3.	sav	lúg	-	-
4.	lúg	lúg	+	-
5.	sav	sav	+	-

Tartalom Identifikáló táblázat

29

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

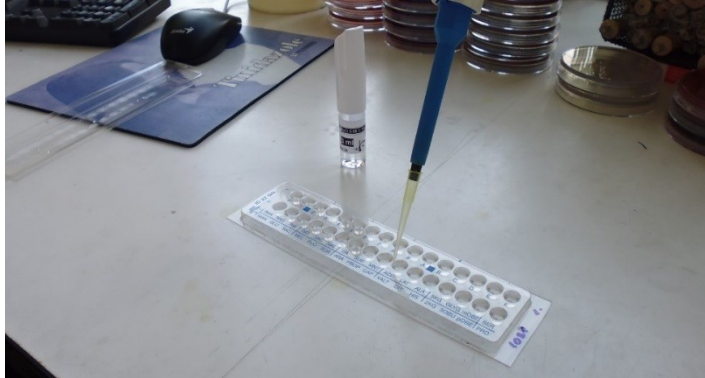
Félautomata rendszerek

- miniatürizált biokémiai tesztek
- könnyen használható gyári identifikáló rendszer
- manuális beoltás
- az inkubációs idő (18-48 óra) letelte után szín- vagy turbiditásváltozás mérése leolvasó készülék segítségével
- kiértékelés számítógépes adatbázis alapján
- eredményközlés: 18-48 óra

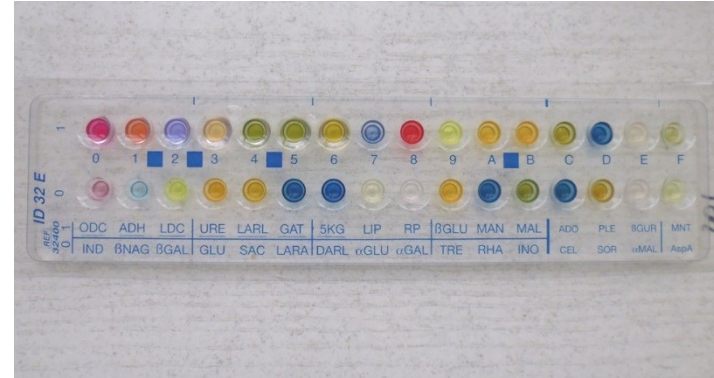
Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

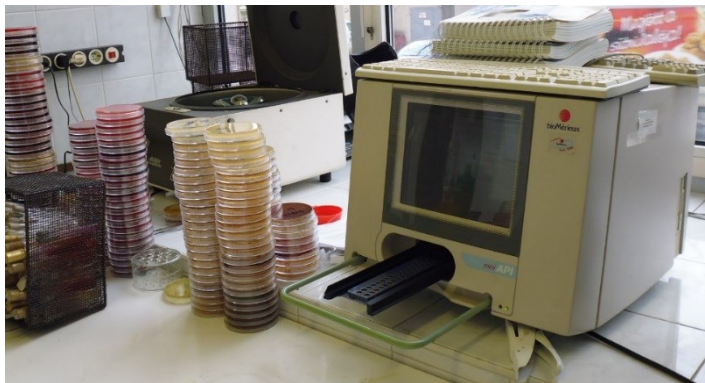
API



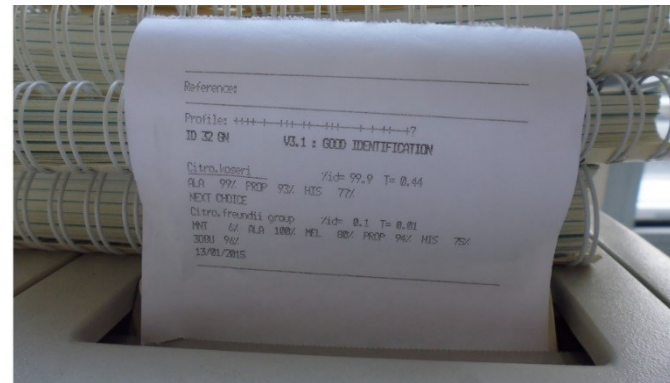
1. Tesztcsík beoltása



2. Tesztcsík inkubáció után



3. Leolvasó készülék



4. Kiértékelt eredmény

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

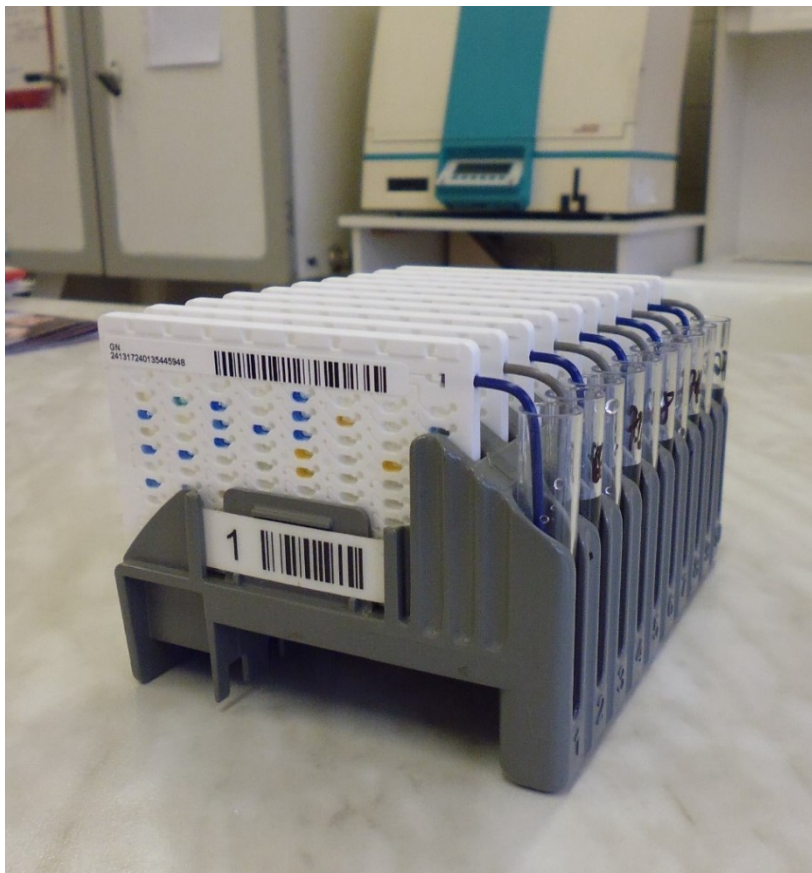
Automata rendszerek

- az ismeretlen baktériumtörzs kitenyésztése után egyetlen standardizált sűrűségű szuszpenzió elkészítése szükséges
- az általunk elkészített szuszpenzióból az automata végzi el az identifikáló kártyák beoltását és inkubálását
- a kártyák leolvasása manuális beavatkozást nem igényel
- az eredmények kiértékelése számítógépes adatbázis segítségével történik
- eredményközlés: 5-8 óra

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Vitek-2



Vitek-2 kártyák



Vitek-2 automata és a hozzátartozó számítógépes munkaállomás

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Gyakorlat I. nap

Feladatok

- biokémiai táptalajok beoltása
 - asztalonként egyféle baktérium található véres agaron, eozin-metilénkéken és Müller-Hinton agaron tenyésztve
 - O/F – metilvörös – ONPG – citrát – ureáz – indol – PAD – lysin-dekarboxiláz próbák, és Nógrády-politróp beoltása
- kataláz-próba kivitelezése
 - *Staphylococcus* (pozitív) és *Enterococcus* (negatív) törzsek Müller-Hinton agaron
- oxidáz-próba kivitelezése
 - *Pseudomonas aeruginosa* (pozitív) és *Escherichia coli* (negatív) törzsek Müller-Hinton agaron

Tartalom

Gyakorlat I. nap

Demonstráció

- különböző baktériumokkal beoltott Nógrády-politrópok
- ugyanazon baktérium törzsek véres, eozin-metilénkék, csokoládé és Müller-Hinton agar táptalajokon
- API, Crystal és Vitek panelek bemutatása

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Gyakorlat II. nap

Feladatok

- előző napon beoltott próbák előhívása, értékelése (összehasonlítása a pozitív ill. negatív demonstrációs kontrollokkal)
- Nógrády-politróp táptalajok értékelése
- azonosítás megkísérlése a mellékelt táblázat alapján

Tartalom

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Gyakorlat II. nap

	<u>O/F</u>	<u>Metilvörös</u>	<u>ONPG</u>	<u>Citrát</u>	<u>Ureáz</u>	<u>Indol</u>	<u>PAD</u>	<u>Lysin-dekarb</u>	<u>Nógrády</u>			
									alsó	ferde	H ₂ S	gáz
<i>Escherichia coli</i>	ferm	+	+	-	-	+	-	+	sav	sav	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ferm	-	+	+	+	-	-	+	sav	lúg	-	+
<i>Proteus morgani</i>	ferm	+	-	-	+	+	+	-/+	lúg	lúg	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	ferm	+	-	+/-	+	-	+	-	lúg	lúg	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ferm	+	+	+	-/+	-	-	-	sav	sav	+	-

[Tartalom](#)

37

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001