

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A húgyúti infekciók leggyakoribb kórokozóinak a kimutatása,
identifikálása és antibiotikum rezisztencia vizsgálata**

Tuza Szabina

Biológia BSc

III. évfolyam

Eszterházy Károly Főiskola

Egerfood Regionális Tudásközpont

Mátrai Gyógyintézet

Témavezető

Dr. Pál Károly

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés – irodalmi áttekintés	5
II. Célkitűzés	8
III. Anyag és módszer	9
3.1 A vizeletminta levétele, tárolása	9
3.2 A vizeletből izolálható mikrobák tenyésztésének célja, kivitelezése	9
3.3 A mikrobák tenyésztésére használt táptalajok	10
3.4 A mikrobák azonosítására használt módszerek	11
3.4.1 Komplex ureum-indol próba	11
3.4.2 Citrátbontás vizsgálata	11
3.4.3 Mozgásvizsgálat	12
3.4.4 Oxidáz-próba	12
3.4.5 ONPG (o-nitrofenil-béta-D-galaktopiranozid) teszt	12
3.4.6 Kataláz próba	12
3.4.7 TSI próba (Triple Sugar Iron)	13
3.4.8 Szénhidrát bontás	13
3.4.9 Eszkulin-hidrolízis	13
3.4.10 SLIDEX Strepto Plus teszt	14
3.4.11 API20E Gram-negatív baktériumok azonosítására szolgáló rendszer	14
3.5 Az antibiotikum rezisztencia meghatározása	14
3.5.1 Korongdiffúziós módszer	14
3.6 Tejsav termelő mikrobák antagonisztikus hatásának vizsgálata	15
3.6.1 Antagonisztikus hatás vizsgálata baktérium pázsit felszínén	15
3.6.2 Antagonisztikus hatás vizsgálata agardiffúziós kísérletekben	16
IV: Eredmények és értékelésük	17
4.1 Tenyésztési és azonosítási vizsgálatok	17

4.2 A leggyakrabban kitenyésztett baktériumok antibiogramjának jellemzése	17
4.2.1 Az <i>Escherichia coli</i> izolátumok antibiogramja	17
4.2.2 A <i>Proteus mirabilis</i> izolátumok antibiogramjának kiértékelése	18
4.2.3 A <i>Klebsiella</i> izolátumok antibiogramjának kiértékelése	19
4.2.4 Az <i>Enterococcus faecalis</i> izolátumok antibiogramja	19
4.2.5 Az antibiogram eredmények összegzése	20
4.3 Tejsav baktériumok antagonista hatásának vizsgálata	20
4.3.1 Vizsgálatok véres agaron és paradicsomlé-kivonattal kiegészített véres agaron	20
4.3.2 Vizsgálatok Müller-Hinton agaron	21
V. Összefoglalás	23
Irodalomjegyzék	25
Köszönetnyilvánítás	27
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	28
Mellékletek	29

Rövidítések jegyzéke

Baktériumok

<i>Ent. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lb. zeae</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
<i>Lc. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Ped. acidolactici</i>	<i>Pediococcus acidolactici</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Sta. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Str. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Biokémiai tesztek

ONPG: o-nitrofenil-béta-D-galaktopiranozid

TSI: Triple Sugar Iron

Antibiotikumok

ampicillin	AM
amoxicillin	AMC
cefepim	CN
cefotaxim	CXM
ceftazidim	CAZ
cefuroxim	CRO
ceftriaxon	CTX
ciprofloxacin	CIP
gentamicin	CN
imipenem	IMP
linezolid	LNZ
nitrofurantoin	F
norfloxacin	NOR
szulfometaxozol	SXT
teicoplanin	TEC
vankomicin	VA

Táptalajok

EM: eozin-metilénkék agar

MH: Müller-Hinton agar

V: véres agar

Egyéb rövidítések

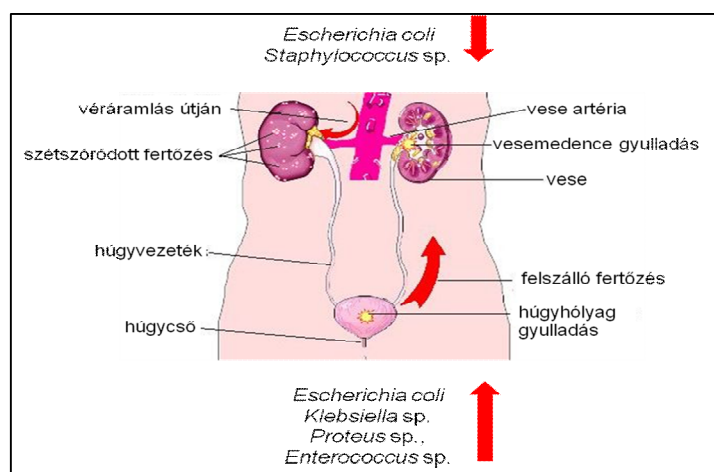
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Antimikrobás Szerekre való Fogékonyságvizsgálat Európai Bizottsága)

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (minimális gátló koncentráció)

I. Bevezetés – irodalmi áttekintés

A húgyúti infekciók (HI) kevés kivétellel bakteriális kórképek, az infekcióért felelős kórokozók főként a normál bélflóra alkotói közül kerülnek ki. Az urogenitális szervek gyulladásai mind a parenchymás szervekben (vese, here, prosztata), mind az üreges szervekben (vesemedence, hólyag, ureter) előfordulhatnak. Az egyik leggyakoribb megbetegedésről van szó, a fertőző betegségek közül a második leggyakoribb, amivel orvoshoz fordulnak az emberek, úgy Magyarországon, mint külföldön (Schappert és Rechtsteiner, 2008). Enyhébb esetben csak kellemetlen tüneteket észlelnek a betegek, súlyosabb formái azonban akár szervi károsodáshoz (Park, 2012) vagy koraszüléshez is hozzájárulhatnak (Kevin, 1996). Anatómiai sajátosságaik miatt (a húgycső nyílása közelebb helyezkedik el a végbélhez, mint a férfiaknál) a nők veszélyeztetettebbek, a fekális eredetű szennyezések az elsődleges okozói a megbetegedéseiknek (Minardi és mtsai, 2011). Egyes kutatók szerint egy nő élete során több mint 30 % eséllyel lép fel a fertőzés (Salvatore és mtsai, 2011), míg mások akár 50 %-ra is becsülik ennek az esélyét (Griebing, 2007). A nők fertőzésre való fogékonyságát a hormonális fogamzásgátlók is növelhetik (Sonnex, 1998), és a hüvelyben megtelepedő baktériumok is okozhatnak problémát a húgycsőbe jutva, ha az egészséges hüvelyflóra egyensúlya felborul (Dielubanza és Schaeffer, 2011). Sok esetben visszatérő jelenségről van szó, a fertőzés megjelenése utáni egy-két éven belül akár többször is tüneteket észlelhet magán a gyógyultnak hitt páciens (Tolkoff-Rubin és mtsai, 2008). A férfiak ugyan nehezebben betegednek meg, de körükben a komplikációk száma magasabb.

A betegséget okozó baktériumok kétféle úton juthatnak el a húgyivarszervekbe: a vérereken keresztül, vagy felszálló fertőzés formájában a húgyvezetéken át (1. ábra).



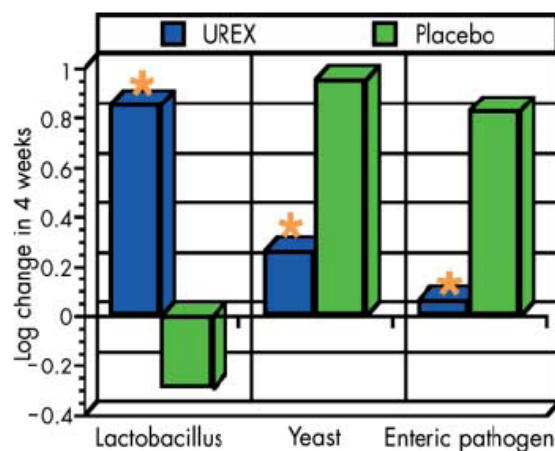
1. ábra Az urogenitális fertőzés kialakulásának lehetőségei

A fertőzések kialakulásában a felszálló fertőzés a leggyakoribb. A hólyagba bejutó kórokozók a hólyag nyálkahártya felszínének antibakteriális védőhatása révén, a vizelet alacsony PH-ja, magas vagy alacsony ozmolaritása miatt nem minden esetben tudnak tartósan életben maradni. Azonban ha képesek megtapadni a húgyhólyag belső felszínén és ott biofilmet tudnak létrehozni, akkor már jelentősen nagyobb a fertőzés veszélye (Anderson és mtsai, 2003). A nőknél 30-50%-ban tovább terjedhet a fertőzés a húgyvezetéken át a vesébe.

A hematogén, vagyis vérerek útján terjedő fertőzés újszülött korban fordul elő leggyakrabban. A baktériumok általában a szervezetben előforduló fertőzőes gócból, gyulladásos folyamatokból, vagy általános fertőző megbetegedésekből kerülnek a véráramba. Ritka esetekben előfordulhat limfogén fertőzés, ekkor a kórokozókat a nyirokkeringés juttatja el a húgyutakba ill. a vesékbe a környezetben lévő gócból.

A fertőzést lefolyása alapján lehet komplikált és nem komplikált. Ezeknek a megkülönböztetése igen fontos, mivel a kezelés előtti és az ezt követő vizsgálatok, valamint az antibiotikus kezelés típusa és ideje különbözik. A komplikált megbetegedés általában férfiaknál fordul elő, anatómiai adottságaik miatt (hosszabb húgycső).

A baktériumok által okozott húgyúti infekciókat antibiotikumokkal kezelik, amihez a vizeletből kitenyésztett kórokozónak meg kell állapítani az antibiotikum érzékenységét. Erre azért is nagy szükség van, mert az antibiotikum rezisztencia ezen patogének körében is folyamatosan terjed (Pallett és Hand, 2010). Emiatt elsősorban a női páciensek kezelésében, gyógyításában nagy szerepe lehet egyéb gyógymódoknak, így pl. a tejsav baktériumoknak, mivel ezek képesek lehetnek a hüvelyi fertőző gócok megszüntetésére (2. ábra; Reid és Bruce, 2003). Szintén hatékony lehet a tözegáfonya kivonata, amelyből a patogének húgyutakban való megtapadását gátló metabolitok keletkeznek az emberi szervezetben (Jass és Reid, 2009).



2. ábra Hüvelyi mikroorganizmusok számának változása probiotikus *Lactobacillus* törzseket tartalmazó kapszula hatására. UREX: *Lb. rhamnosus* GR-1 + *Lb. fermentum* RC-14 keveréke. Forrás: Reid és Bruce, 2003.

Mivel a lakosságnak jelentős hányadát érinti, a húgyúti fertőzések diagnosztizálása és gyógyítása jelentős emberi és anyagi erőforrásokat követel meg az egészségügytől. Mindamellet egy igen érdekes kutatási terület is, hiszen a patogéneknek az általánosságban használt antibiotikumokkal szemben mutatott rezisztenciája új kihívások elé állítja a kutatókat.

Laboratóriumi munkám legnagyobb részét a Mátrai Gyógyintézet Központi Laboratóriumának bakteriológiai részlegén (Mátraháza) végeztem. A laboratóriumi munka mellett a feldolgozott minták eredményeinek összegzését, értékelését és elemzését készítettem el a 2011.09.01-től-2011.08.31-ig tartó időintervallumra vonatkozóan. A laboratórium igen sokrétű és nagyszámú diagnosztikai tevékenységet végez, besorolása I. kompetencia szint+ POCT. Évente több mint 190 000 minta feldolgozása történik itt a klinikai kémia, hematológia, immunkémia, szerológia és bakteriológia területén. A bakteriológiai részleg klinikai vegyes anyagok feldolgozását végzi (kb. 8 000 vizsgálat/év). A vizsgálati minták az ellátási terület háziorvosaitól, az intézmény szakrendeléseiről és fekvőbeteg ellátó osztályairól érkeznek. A bakteriológia részleg a közegészségügyi-járványügyi útmutató alapján végzi a beérkező minták feldolgozását.

Az antagonizmus vizsgálatokat az Eszterházy Károly Főiskola Egerfood Regionális Tudásközpontjának mikrobiológiai laboratóriumában végeztem.

II. Célkitűzések

Munkám során a húgyúti infekciókban leggyakrabban előforduló uropatógén kórokozó baktériumokat tanulmányoztam, célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. Megállapítani, hogy egy klinikai vegyes anyagot feldolgozó bakteriológiai laboratóriumba beküldött vizeletminták között milyen arányban fordulnak elő patogén baktériumokat tartalmazók (amelyek húgyúti infekcióra utalnak).
2. Biokémiai tesztekkel azonosítani az uropatógén kórokozókat, ha lehet faj, de legalább nemzetség szintjén; egyúttal megállapítani az egyes fajok előfordulási arányát.
3. Kiértékelni a kitenyésztett kórokozók antibiotikummal szembeni rezisztenciájának mértékét, különös tekintettel az esetleges új rezisztenciák feltűnésére.
4. Tejsav termelő mikrobák antagonisztikus hatásának felmérése az általunk izolált patogén fajok egy-egy törzsével szemben.

III. Anyag és módszer

Az alább felsorolt anyagok és eljárások a rutin klinikai mikrobiológiai vizsgálatok során használatosak, ebből kifolyólag eltérés mutatkozhat a kutató laborokban használt módszerekhez képest. Így pl. a mikrobák azonosításakor a standard biokémiai tesztekre hagyatkoztunk, noha kutató laboratóriumokban manapság már mindennapos gyakorlat a DNS-alapú vizsgálat (16s rDNS szekvencia alapján történő azonosítás, vagy fajspecifikus primerek használata).

3.1 A vizeletminta levétele, tárolása

A mintavételre legalkalmasabb a reggeli vizelet. Mintavétel előtt nagyobb folyadékbevitel nem célszerű, mivel a vizelet felhígulásával a csíraszám csökken. A mintát mindig közvetlenül a bakteriológiai vizsgálatra használt steril edénybe vagy csőbe vetettük le a páciensekkel. A vizelet első részét hagyniuk kellett kiürülni, majd a vizelet folyását meg kellett szakítaniuk a középső porcióból és 4-5 ml-nyit steril edénybe kellett felfogniuk úgy, hogy közben az edény szája semmihez se érjen hozzá.

A vizeletet, levétele után 2 órán belül feldolgoztuk, vagy legfeljebb 24 órán át tároltuk 4-6 °C-on hűtőszekrényben. A vizeletvételt megismételtük, ha a mintát levétel után két órán túl, hűtés nélkül tárolták.

3.2 A vizeletből izolálható mikrobák tenyésztésének célja, kivitelezése

A laboratóriumi vizsgálat célja a pyuria (gennyvizelés) és a bakteruria fennállásának igazolása vagy kizárása. A pyuriát a vizelet üledék mikroszkópos vizsgálatával lehet igazolni, 10 sejt/ml feletti leukocytaszám pyuriát jelez.

A bakteruria, vagyis a húgyúti infekció diagnózisának tenyésztéssel történő felállításához szemikvantitatív, vagy kvantitatív csíraszám meghatározást kell végezni. A vizelet-tenyésztés a nők akut, nem komplikált cystitisénél általában nem szükséges, mert a kórokozók és antibiotikum-érzékenységük megjósolható. A csíraszám megadásának csak uropatogének esetében van jelentősége. A szignifikáns bakteruriára utaló csíraszám, ürített

vizelet esetében nagyobb vagy egyenlő 10^5 CFU/ml.

A laboratóriumba beérkezett vizeletmintákat közvetlenül a feldolgozás előtt gondosan megkevertük. A szemikvantitatív módszer kivitelezése: kalibrált műanyag kaccsal vagy automata pipettával a jól elkevert centrifugálatlan vizeletből 10 μ l-t egy nem szelektív véres (V) és egy szelektív-differenciáló eozin-metilénkék (EM) táptalaj felszínének egyharmadára oltottunk és szélesztettünk. A leoltott táptalajokat 18-24 órán át 36 ± 1 °C-on inkubáltuk aerob módon. A kitenyészett telepek számát figyelembe véve adjuk meg a becsült csíraszámot. A vizeletet felhasználás előtt nem szabad dúsítani.

3.3 A mikrobák tenyésztésére használt táptalajok

Véres agar (V) (Biolab): Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok egyaránt képesek rajta növekedni, morfológiai elkülönítésükhöz és az antagonizmus vizsgálatokhoz használtuk. A felolvasztott alaptáptalajt (Biolab) a vér hozzáadása előtt kb. 45 °C-ra lehűtöttük, hogy a vérben lévő vörösvértestek ne károsodjanak, majd a dermedési hőfokot megközelítő hőmérsékletű táptalajból lemezt öntöttünk. A baktériumok felismerésében segítséget nyújtott a pigmentáltság, morfológia, különféleképpen jelentkező vörösvértest-oldó képességük (α -, β -, γ -hemolízis).

Eozin-metilénkék agar (EM) (Biolab): szelektív differenciáló táptalaj. Nátrium-szulfátot tartalmaz, amely a Gram-pozitív baktériumok növekedést gátolja, így a Gram-negatív baktériumok tiszta szubkultúrája tenyészthető. Laktózt tartalmaz, ezért a laktózbontó baktériumok esetében a képződött sav kicsapja az eozint, a csapadékot a metilénkék megfesti, és így a telepek a lila változó árnyalataira színeződnek (pl.: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Ez a savképzés csak a telepek alatt mutatkozik, így a laktóz bontására nem képes baktériumok is felismerhetők szintelen telepeik alapján.

Müller-Hinton agar (Biolab): az antibiotikum rezisztencia (korongdiffúziós módszer) és antagonizmus vizsgálatokhoz használtuk.

Paradicsomlé-kivonattal kiegészített agar: véres agar 1 % paradicsomlé-kivonattal dúsítva, az antagonizmus vizsgálatokhoz használtuk.

3.4 A mikrobák azonosítására használt módszerek

3.4.1 Komplex ureum-indol próba

Az ureumból az ureáz NH_3 -t és CO_2 -ot szabadít fel, melyekből a táplevesben $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ keletkezik, így ezzel a vizsgálattal elkülöníthetők az ureázzal rendelkező és nem rendelkező baktériumok. Az indol próba alapja, hogy a baktériumok a pepton bontása során a triptofánt hidrolizálják és deaminálják, ezt a reakciót (vagy a hiányát) a Kovács-féle indol reagenssel lehet kimutatni.

A kombinált, gyárilag elkészített folyékony táptalajba (Biolab) a szintenyészetből 1-2 telepnyi baktériumot szuszpendáltunk, majd 36 ± 1 °C-on 24 órán át inkubáltuk CO_2 -mentes közegben.

Az ureum próba értékelése:

- erősen pozitív ureáz reakció: a táptalaj élénkvörös, az indol reagens hozzáadása során gáz- és ködképződés tapasztalható (pl. *P. mirabilis*).
- pozitív ureáz reakció: a táptalaj kevésbé élénkvörös színű, gáz- és ködképződés nincs (pl. *K. pneumoniae*).
- negatív ureáz reakció: a táptalaj sárga vagy narancsszínű (pl. *E. coli*).

Az indol próba értékelése:

- pozitív indol próba: a felülúszó reagens piros (pl. *E. coli*).
- negatív indol próba: a felülúszó reagens sárga (pl. *P. mirabilis*).

3.4.2 Citrátbontás vizsgálata

Ha a táptalajban szénforrásként csak szerves sav, nitrogénforrásként csak szervetlen ammónium só áll a baktérium rendelkezésre, a bontás kizárólag oxidatív úton folyik, végtermékként pedig CO_2 keletkezik. A baktérium szaporodása során a táptalaj lúgos kémhatású lesz, amit indikátor jelez. Ezt használjuk ki a szerves savak sóinak (pl. citrát) hasznosításának a vizsgálatakor.

A gyárilag elkészített nátrium-citrátot és indikátort tartalmazó folyékony táptalajba (Biolab) 1-2 telepnyi baktériumot szuszpendáltunk, majd 36 ± 1 °C-on 24 órán keresztül inkubáltuk. Pozitív reakció során a táptalaj élénk rózsaszín elszíneződést mutat (pl. *P. mirabilis*), míg negatív reakció során a táptalaj színváltozást nem mutat (pl. *E. coli*).

3.4.3 Mozgásvizsgálat

Baktériumok szűrt tenyészetét vizsgáljuk ezen a módon. Nem tápanyagigényes, fakultatív anaerob baktériumok (pl. az *Enterobacteriaceae* genus tagjai) mozgását, agar táptalajban való vándorlásuk alapján határozhatjuk meg, amely segít a fajszerű azonosításban. Pozitív a teszt, ha diffúz növekedést tapasztalunk az egész táptalajban (pl. *E. coli*), míg negatív, ha növekedés csak a beoltott felszínen van (pl. *Klebsiella* sp.).

3.4.4 Oxidáz-próba

A citokróom-oxidáz enzim jelenlétére utal a mikróbában, mely enzimmal csak aerob, fakultatív anaerob és mikroaerofil baktériumok rendelkeznek.

A vizsgálandó baktériumot, oxidáz reagenssel átitatott szűrőlapra (Biolab) helyezzük. Pozitív teszt esetén az oxidáz reagenssel azonnal reagáló baktérium pirosra színeződik (pl. *Pseudomonas* sp.), míg a 30 mp múlva reagáló baktérium halványpiros elszíneződést mutat (pl. *Haemophilus* sp.). Negatív teszt esetén az oxidáz reagenssel nem reagáló baktérium nem színeződik el (pl. *E. coli*).

3.4.5 ONPG (o-nitrofenil-béta-D-galaktopiranozid) teszt

Ez a teszt a kései laktózbontás kimutatására szolgál, mivel a lassan bontók csak intracelluláris β -galaktozidázt termelnek, ennek detektálására alkalmas az ONPG próba. Ha az enzim jelen van, akkor az ONPG sárga színű orto-nitrofenollá hidrolizálódik.

Steril csőbe desztillált vizet tettünk, majd a folyadékba 1-2 telepnyi baktériumot szuszpendáltunk, majd belehelyeztük az ONPG tartalmú korongot (Biolab). Ezt követően 24 órán át 36 ± 1 °C-on inkubáltuk a csövet. Pozitív teszt: sárga színváltozás látható (pl. *E. coli*). Negatív teszt: nincs színváltozás (pl. *Proteus* sp.).

3.4.6 Kataláz próba

A baktériumok légzésének végterméke egyes fajoknál H_2O_2 , amely mérgező lenne a baktériumra, hogyha az nem termelne katalázt, ami képes a hidrogén-peroxidot vízre és oxigénre bontani.

30 %-os hidrogén-peroxid oldatot tárgylemezre cseppentünk, majd egy másik tárgylemez sarkával 1-2 telepnyi baktériumot a cseppbe kenünk. Pozitív a próba, ha erőteljes gázképződést tapasztalunk (pl. *Sta. aureus*), míg negatív próba esetén nincs gázképződés (pl. *Ent. faecalis*).

3.4.7 TSI próba (*Triple Sugar Iron*)

A fermentatív baktériumok meghatározására használják. A próba (Biolab) háromféle cukrot (glukóz, laktóz, szacharóz), fenolvörös indikátort, vasszulfátot és nátrium-tioszulfátot tartalmaz. A táptalajt a kémcsőben úgy szilárdítják meg, hogy az alsó magas rész és a felső ferde rész egyenlő magasságú legyen. Alkalmas cukorbontás vizsgálatára, kén-hidrogén és egyéb gázképzés kimutatására.

Gyárilag elkészített táptalajba (Biolab) oltottunk 1-2 telepnyi baktériumot, majd a szuszpenziót 37 °C-on inkubáltuk 24 órán át. Pozitív eredmény: ha vizsgált törzs bontja a glukózt, laktózt vagy szacharózt, savas színváltozás látható a táptalaj alsó és felső részén egyaránt (pl. *E. coli*). A táptalaj teljes magasságában a lúgos szín (piros) nem fermentáló baktériumra utal (pl. *Pseudomonas* sp.) Ha a törzs kén-hidrogént termel, az alsó és felső rész határán fekete elszíneződés mutatkozik (pl. *P. mirabilis*). A gáztermelést a gázbuborékok jelenléte vagy a táptalaj szétrobbanása jelzi (pl. *E. coli*). Negatív eredmény: a táptalajban elváltozás nem történik.

3.4.8 Szénhidrát bontás

A különböző szénhidrátok bontása során keletkezett savak és gázok kimutatása a leggyakrabban alkalmazott próbák közé tartozik a klinikai gyakorlatban. A táptalaj peptonvíz, amelyben különböző szénhidrátok (dextróz, mannit, szacharóz, inozit, laktóz) vannak oldva. A szénhidrát bontást a megfelelő indikátor jelzi.

Gyárilag elkészített adott szénhidrátot tartalmazó (dextróz, mannit, szacharóz, inozit, laktóz) táptalajba (Biolab) szuszpendáltuk a baktériumokat, majd 37 °C-on inkubáltuk a tenyészetet 24 órán át. Pozitív teszt: a táptalaj sárga színűre változik. Negatív teszt: a táptalaj színe nem változik.

3.4.9 Eszkulin-hidrolízis

Az eszkulin hidrolízisének végtermékeként eszkuletin és glukóz keletkezik. Az eszkuletin - koncentrációjától függően - sötétbarna vagy fekete komplexet képez a táptalajban lévő vasionokkal. A D-csoportú *Streptococcus*ok és *Enterococcus*ok számára taurokolát (epesavas-só) vagy nátrium-azid hozzáadásával szelektívvé teszik.

A kísérlet során mákszemnyi tenyészetet oltottunk a táptalajba (Biolab), majd 36±1 °C-on inkubáltuk 24 órán át. Pozitív próba: fekete vagy barna elszíneződést látunk (pl. *Ent. faecalis*). Negatív próba: színváltozás nincs (pl. *Str. pyogenes*).

3.4.10 SLIDEX Strepto Plusz teszt

A legtöbb *Streptococcus* csoportspecifikus antigénekkal rendelkezik, amelyek kivonhatók és a latex agglutinációs eljárás során azonosíthatók (a specifikus antiszérumhoz kötött latex részecskék a megfelelő antigénhez kötődnek, amely a latex részecskék szemmel látható kicsapódását okozza). A SLIDEX Strepto Plusz teszt (Biolab) a Lancefield-féle A, B, C, D, F, G csoportba tartozó *Streptococcusok* meghatározására szolgál. Pozitív eredmény: agglutináció látható. Negatív eredmény: agglutináció nem látható.

3.4.11 API20E Gram-negatív baktériumok azonosítására szolgáló rendszer

A baktériumok automatizált mikromódszerekkel (API = Automated Profile Identification) való azonosítására szolgáló eljárás. Az API20E az *Enterobacteriaceae* nemzetség tagjainak és egyéb nem tápigényes Gram-negatív pálcáknak az azonosítására szolgáló rendszer. Az API20E dehidratált szubsztrátokat tartalmazó mikrocsovékból áll. Az inkubálás során a bakteriális anyagcsere színváltozást idéz elő, amely vagy spontán vagy reagensek hozzáadására következik be. A színváltozás nemzetség- vagy akár fajszintű azonosítást tesz lehetővé.

5ml steril desztillált vízbe 1 kacsnyi telepet szuszpendáltunk, majd a szuszpenziót homogenizáltuk. Steril Pasteur pipettával egyenletesen, buborékmentesen a mikrocsovékba pipettáztuk a baktérium szuszpenziót. Az L-arginin (ADH), L-lizin (LDC), L-ornitin (ODC), kén-hidrogén (H₂S) és ureum (UREA) tesztek esetén anaerob körülményeket biztosítottunk paraffinolaj használatával. A csöveket 36±1 °C-on inkubáltuk 18-24 órán át. Az értékelő adatlapon feltüntettük az egyes reagensekhez tartozó színeket (a színreakciókat az 1. melléklet mutatja be), melyek egy 7 számjegyből álló adatsort eredményeztek. Ezen számsor alapján a baktériumot az „apiweb” szoftver segítségével azonosítottuk.

3.5 Az antibiotikum rezisztencia meghatározása

3.5.1 Korongdiffúziós módszer

A gyorsan növő aerob baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálatára alkalmas szemikvantitatív módszer, melynek helyes kivitelezésénél elengedhetetlen, hogy a vizsgálat az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ajánlásainak megfelelően történjen (internet 1. hivatkozás). E módszernél Müller-Hinton

táptalajon készítettük el a baktérium pázsitot. A táptalaj rétegvastagságának pontos betartása (4 mm) ennél a módszernél különösen fontos, mert a diffúzió a korong környezetében radiálisan zajlik. Vékonyabb réteg esetén nagyobbak, vastagabb réteg esetén kisebbek lesznek a zónák.

Összesen 16 antibiotikummal (ampicillin, amoxicillin, cefepim, cefotaxim, ceftazidim, cefuroxim, ceftriaxon, ciprofloxacín, gentamicin, imipenem, linezolid, nitrofurantoin, norfloxacín, szulfometaxozol, teichoplanin, vankomicin) végeztük el a vizsgálatot, az eredmények alapján pedig felállítottuk az egyes kórokozók antibiogram profilját.

Az antibiotikum rezisztencia kísérleteket az EUCAST szabályok előírása szerint az alábbi módon végeztük el:

1. A baktérium szuszpenziót nem szelektív, antimikróbás szert nem tartalmazó, de differenciáló táptalajon kinőtt telepekből készítettük. A szuszpenzió denzitása 0,5 McF, 0,85% fiziológiás sóoldatban.
2. A további lépéseket a „15 perces szabály” betartásával végeztük el, vagyis minden elvégzett folyamat után 15 perc szünetet tartottunk.
A szuszpenzió elkészítését követően a baktériumokat szélesztettük a táptalajon, majd elhelyeztük az antibiotikum korongokat a pázsiton.
3. A lemezeket 16-20 órán keresztül inkubáltuk 35 ± 1 °C-on.

3.6 Tejsav termelő mikrobák antagonisztikus hatásának vizsgálata

Az alábbi kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy tejsav termelő baktériumok milyen mértékű bakteriosztatikus vagy baktericid hatást fejtenek ki az általunk izolált uropatogén mikrobák egy-egy véletlenszerűen kiválasztott törzsére. Az alábbi tejsav termelő törzsekkel végeztük a kísérletet: *Lb. acidophilus* 1 (saját izolátum), *Lb. acidophilus* 2 (saját izolátum), *Lb. acidophilus* 3 (saját izolátum), *Lb. acidophilus* NCAIMB 01132, *Lb. zaeae* DSM 20178, *Lc. lactis* ATCC 7830, *Lc. lactis* ATCC 11454, *Ped. acidilactici* ATCC 8042.

3.6.1 Antagonisztikus hatás vizsgálata baktérium pázsit felszínén

A vizeletből kitenyésztett uropatogén mikrobákból szélesztettünk véres agarra, valamint paradicsomlé-kivonattal kiegészített véres agarra. A pázsitra a tejsav termelő törzsekből oltókaccsal csíkot húztunk, majd a tenyészeteket anaerob módon inkubáltuk 37 °C-

on. A kiértékelés során a tejsav termelő törzsek körüli feltisztulási zónát mértük.

3.6.2 Antagonisztikus hatás vizsgálata agardiffúziós kísérletekben

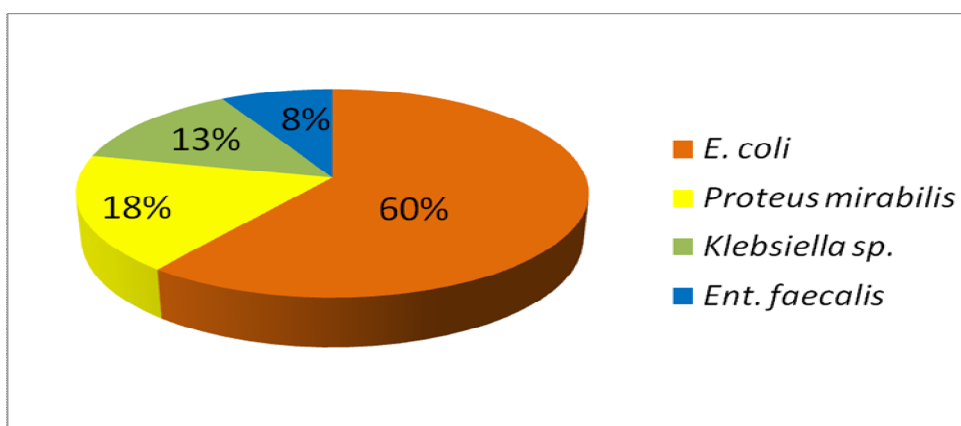
A vizeletből kitenyésztett uropatógén mikrobák szuszpenzióit Müller-Hinton agarba kevertük és lemezt öntöttünk. A lemezekbe dugófúróval 4-4 lyukat fúrtunk, majd ezekbe belemértünk 100-100 µl-t minden tejsav baktérium 16 órás tenyészetének szuszpenziójából, illetve sejtmentes felülszójából. A lemezeket ezután anaerob módon inkubáltuk 37 °C-on. A kiértékelés során a lyukak körüli feltisztulási zónát mértük.

IV: Eredmények és értékelésük

4.1 Tenyésztési és azonosítási vizsgálatok

A Mátra Gyógyintézetben eltöltött 1 évem alatt összesen 1188 vizeletminta érkezett be a laboratóriumba. Ebből 467 minta (39,3 %) volt pozitív (vagyis valamilyen uropatogén kórokozót tartalmazott), míg 721 minta (60,7 %) negatív volt. Ez az eredmény összhangban van a nemzetközi felmérésekkel, miszerint a húgyúti fertőzések előkelő helyen szerepelnek a betegségek ranglistáján.

Az izolátumokból tisztatenyészetet készítettünk, majd biokémiai tesztekkel azonosítottuk a baktériumokat. A leggyakoribb kórokozó az *E. coli* volt (282 minta, 60 %), ezt sorrendben a *P. mirabilis* (85 minta, 18 %), *Klebsiella* sp. (62 minta, 13 %) és az *Ent. faecalis* (38 minta, 8 %) követték. A kórokozók megoszlását a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra Vizeletmintából kitenyésztett uropatogén kórokozók százalékos megoszlása

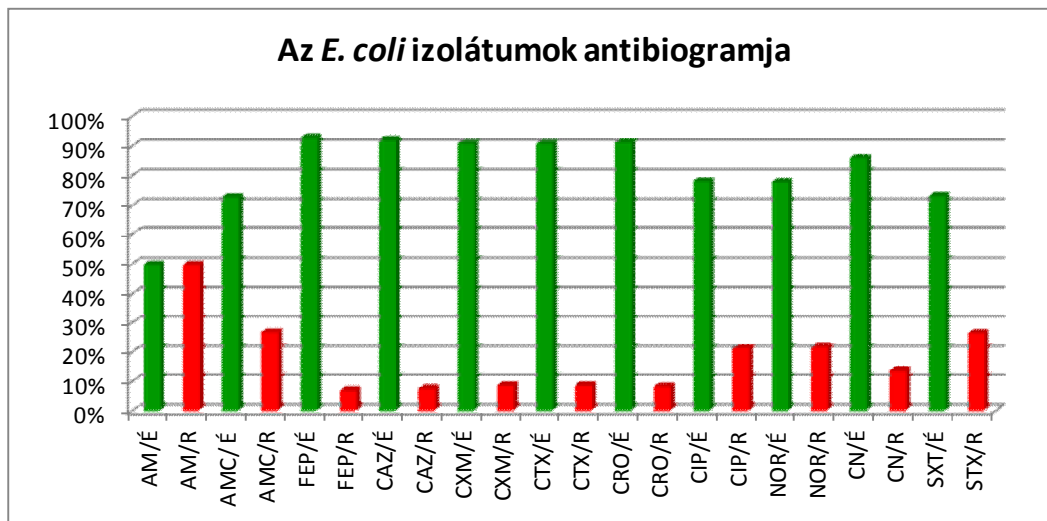
A vizeletminták 90 százalékából csupán egy kórokozót, míg 10 százalékában két vagy több patogént sikerült kitenyészteni. A *Klebsiella* izolátumok fajsztípusú azonosítására nem került sor.

4.2 A leggyakrabban kitenyésztett baktériumok antibiogramjának jellemzése

4.2.1 Az *Escherichia coli* izolátumok antibiogramja

Az *E. coli* elsődlegesen érzékeny minden β -laktám antibiotikumra, az érzékeny törzsek aránya: ampicillin - 50 %, amoxicillin/clavulánsav - 73 %, cefepim - 93 %, ceftazidim - 92 %, amikacin - 92 %, gentamicin - 92 %, tobramicin - 92 %, netilmicin - 92 %, fusidinsav - 92 %, rifampicin - 92 %, trimetoprim-sulfametoprazol - 92 %, nitrofurantoin - 92 %, fosfomicin - 92 %, baclofen - 92 %, ceftriaxon - 92 %, cefepim - 93 %, ceftazidim - 92 %, amikacin - 92 %, gentamicin - 92 %, tobramicin - 92 %, netilmicin - 92 %, fusidinsav - 92 %, rifampicin - 92 %, trimetoprim-sulfametoprazol - 92 %, nitrofurantoin - 92 %, fosfomicin - 92 %, baclofen - 92 %.

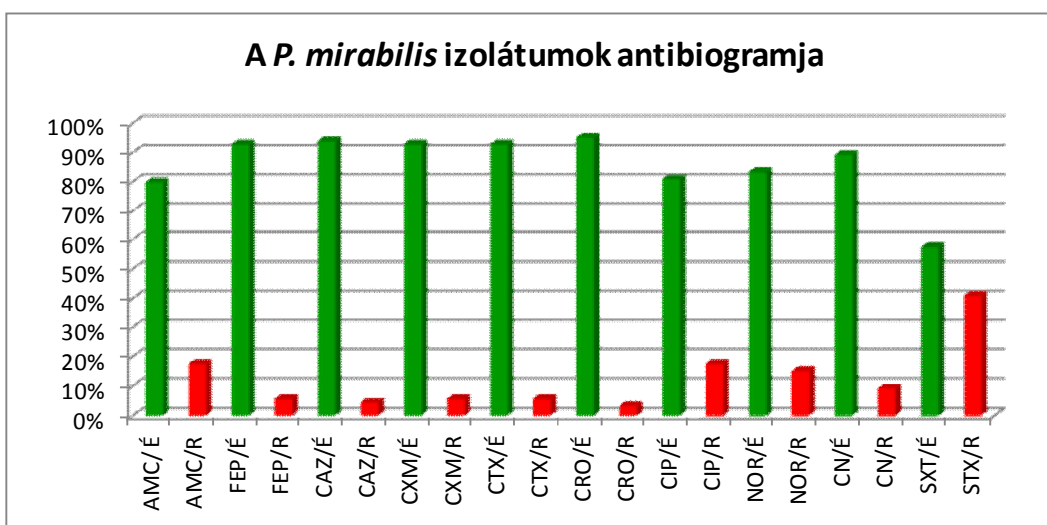
cefuroxim - 91%, cefotaxim - 91%, ceftriaxon - 91%. Ugyanúgy elsődlegesen érzékeny az aminoglikozidokkal (gentamicin - 86%), fluorokinolonokkal (ciprofloxacim - 78%, norfloxacim - 78%) és a szulfonamidokkal (szulfometaxozol - 73%) szemben (4. ábra). A nők nem komplikált húgyúti fertőzéseiben rendszerint ilyen antiobiogramú *E. coli* tenyészik ki.



4. ábra Az *E. coli* izolátumok antiobiogramja.

4.2.2 A *Proteus mirabilis* izolátumok antiobiogramjának kiértékelése

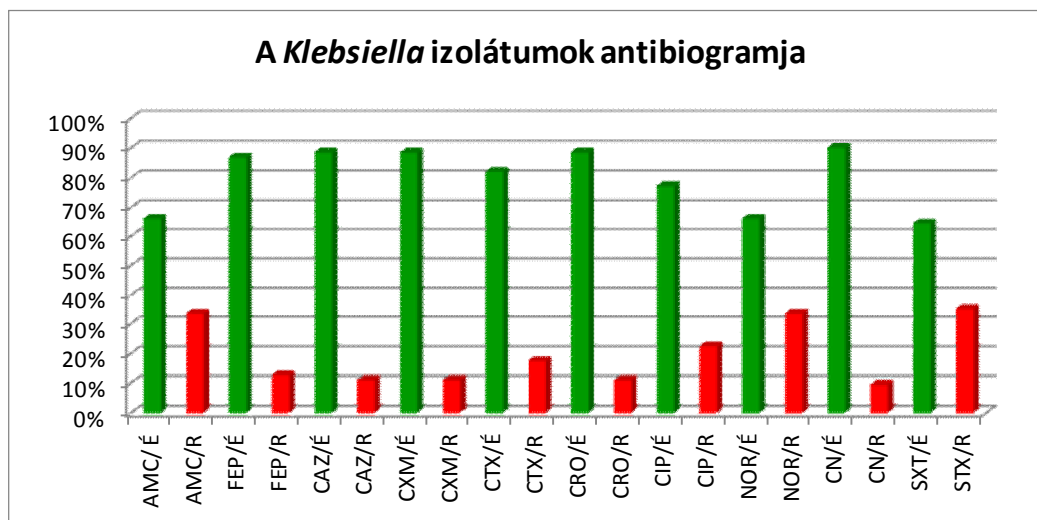
A *Proteus* genusba tartozó speciestekre egységesen jellemző a polymixinnel, a colistinnek és a tetraciklinnek szembeni természetes rezisztencia. A *Proteusok* érzékenyek minden β -laktám antibiotikumra, az érzékeny törzsek aránya: ampicillin - 80%, amoxicillin/clavulánsav - 80%, cefepim - 93%, ceftazidim - 94%, cefuroxim - 93%, cefotaxim - 93%, ceftriaxon - 95% (5. ábra).



5. ábra A *P. mirabilis* izolátumok antiobiogramja

4.2.3 A *Klebsiella* izolátumok antibiogramjának kiértékelése

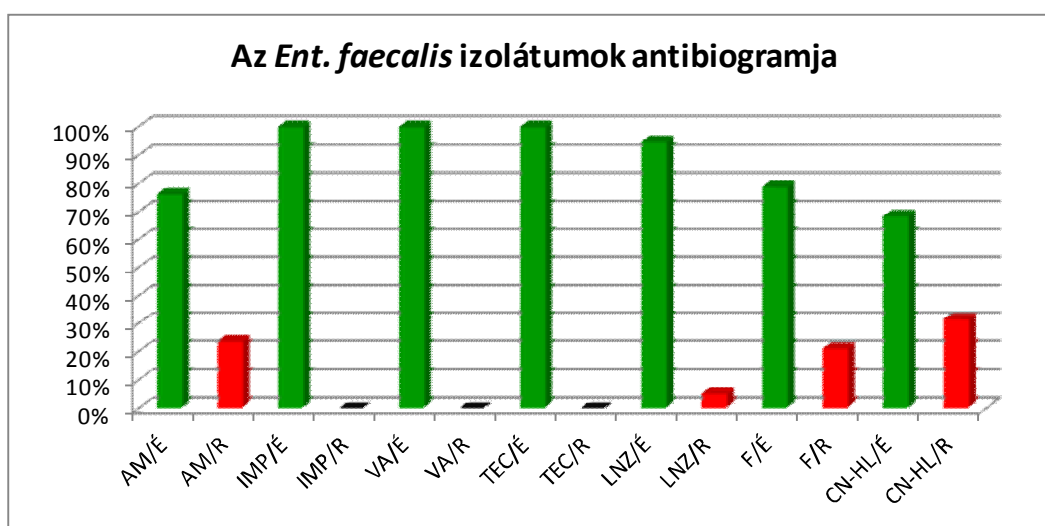
A β -laktamáz enzim következtében természetes rezisztenciával rendelkeznek az aminopenicilinekkel (ampicillin) szemben, de a többi β -laktám antibiotikumra érzékenyek. Az általunk izolált törzsek között az érzékenyek aránya: amoxicillin/clavulánsav - 66%, cefepim - 87%, ceftazidim - 89%, cefuroxim - 89%, cefotaxim - 82%, ceftriaxon - 89% (6. ábra).



6. ábra A *Klebsiella* izolátumok antibiogramja

4.2.4 Az *Enterococcus faecalis* izolátumok antibiogramja

Az *Enterococcus*ok természetes rezisztenciát mutatnak valamennyi cefalosporinnal, klindamicinnel, és a metronidazollal szemben (7. ábra).



7. ábra Az *Ent. faecalis* izolátumok antibiogramja

A penicillin és származékai iránt sokkal kevésbé érzékenyek, mint az igazi *Streptococcus*ok. Az aminoglikozidok is csak mérsékelten hatékonyak az *Enterococcus*okkal szemben (gentamicin - 66%), viszont az általunk izolált törzsek 100%-ban érzékenyek bizonyultak a glikopeptid antibiotikumokra (teicoplanin - 100%, vankomicin - 100%) (7. ábra).

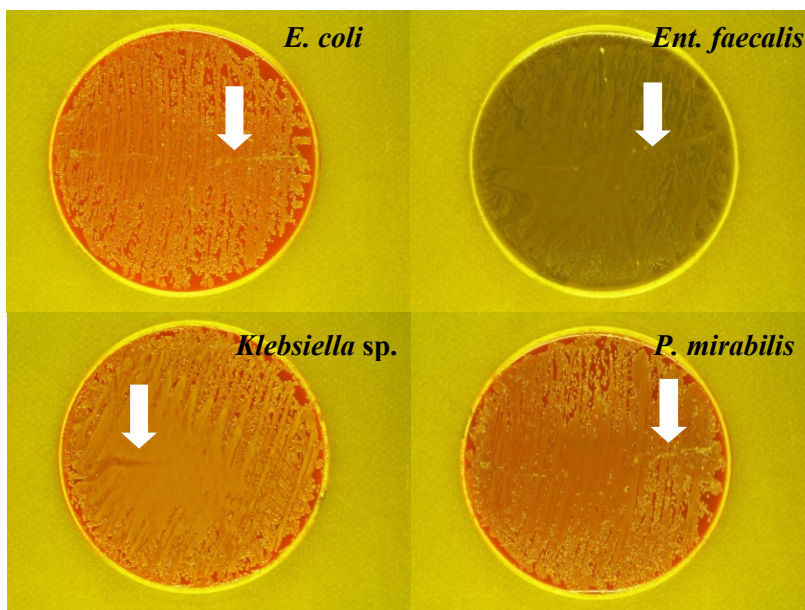
4.2.5 Az antibiogram eredmények összegzése

A 2. melléklet táblázatában látható, hogy melyek azok az antibiotikumok, amelyekkel szemben az egyes mikrobák törzseinek legalább 85 %-a érzékenyek bizonyult.

4.3 Tejsav baktériumok antagonista hatásának vizsgálata

4.3.1 Vizsgálatok véres agaron és paradicsomlé-kivonattal kiegészített véres agaron

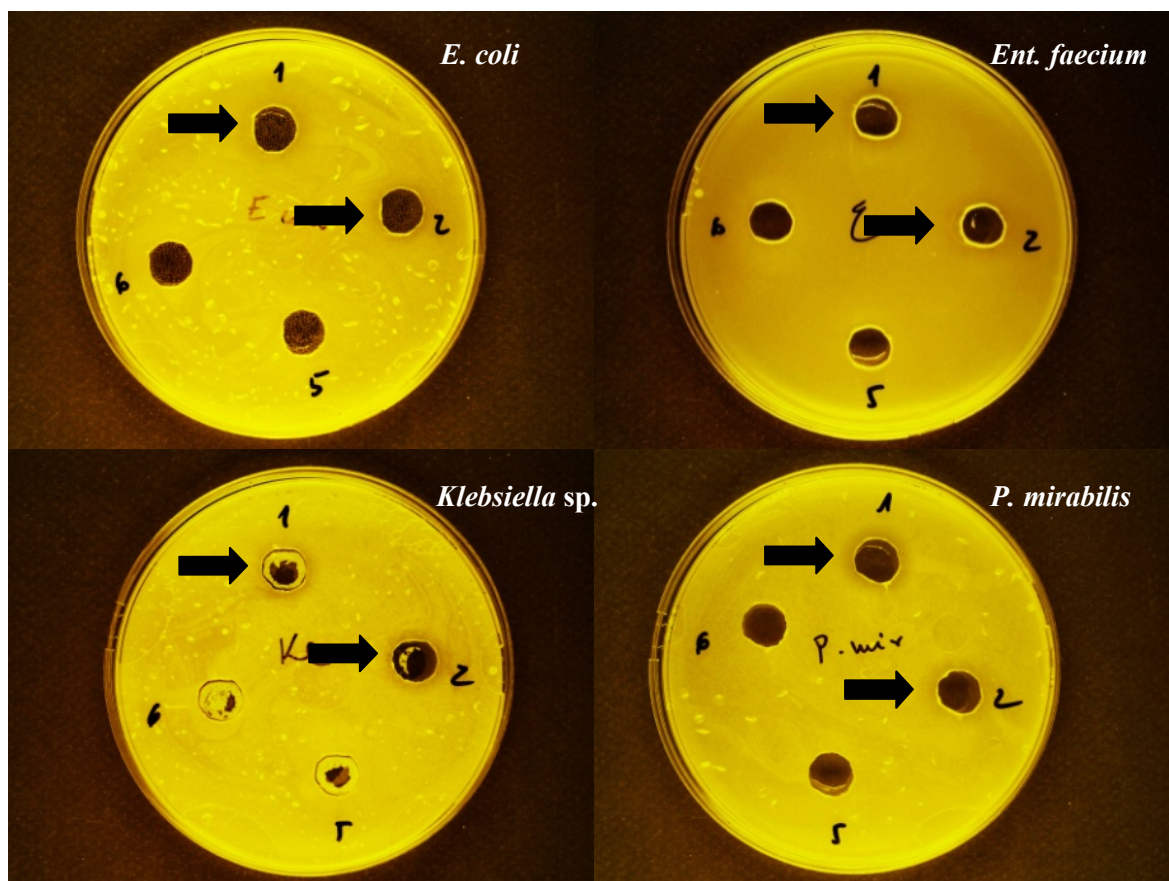
Az uropatogén baktériumokból szélesztett pázsitra leoltott tejsav baktériumok nem tudtak kifejteni antagonista hatást, mert a tenyésztés során a patogén törzsek egyszerűen túlnőtték őket (8. ábra).



8. ábra Tejsav baktériumok antagonizmusának vizsgálata szélesztett uropatogén mikrobák telepein. A fekete színnel irt mikrobákat szélesztettük a lemezekre, míg a fehér nyilak a tejsav baktériumok leoltása után látható csíkot jelzik.

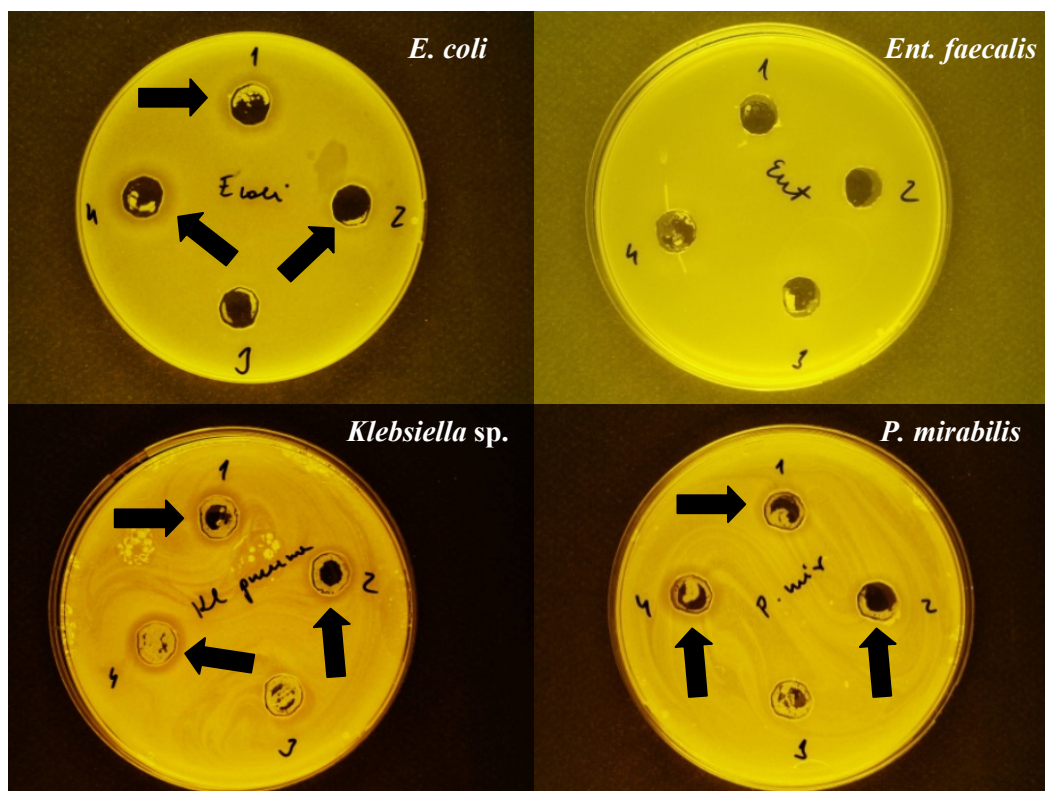
4.3.2 Vizsgálatok Müller-Hinton agaron

A kórokozó baktériumokat tartalmazó lemezekbe dugófúróval fúrtunk lyukakat, majd ezekbe pipettáztunk 100-100 µl-t a tejsav baktériumok 16 órás tenyészeinek szuszpenzióiból, valamint sejtmentes felülúszóikból. Az élő sejtekkel történt leoltások során a *Lb. acidophilus* 1. valamint a *Lb. acidophilus* NCAIMB 01132 jelű törzsek fejtettek ki különböző mértékű (de általában meglehetősen csekély) gátló hatást (9. ábra) mindegyik patogénre.



9. ábra Tejsav baktériumok élő sejtjei antagonista hatásának vizsgálata uropatogén baktériumok tenyészetén. A fehér színnel írt nevek a lemezt alkotó patogének; 1. *Lb. acidophilus* 1. törzs sejtjeinek leoltási helye; 2. *Lb. acidophilus* NCAIMB 01132 leoltási helye. A fekete nyilak mutatják az észlelt feltisztulási zónákat.

A baktériumok sejtmentes felülúszóival végzett kísérletekben a fentieknél jobb hatásfokot tapasztaltunk. Összesen 3 tejsav termelő törzs, a *Lb. acidophilus* 1., a *Lb. acidophilus* 3. és a *Lb. acidophilus* NCAIMB 01132 felülúszóit tartalmazó lyuk körül alakultak ki feltisztulási zónák, melyeknek a kiterjedése meghaladta az élő sejtes kísérletekben tapasztalt zónák méretét. Érdekes módon a felülúszók még a korábbi, élő sejtes kísérletben tapasztalt csekély mértékű gátlást sem fejtettek ki az *Ent. faecalis*-ra (10. ábra).



10. ábra Tejsav baktériumok sejtmentes felülűszői antagonista hatásának vizsgálata uropatogén baktériumok tenyészetén. A fehér színnel írt nevek a lemezt alkotó patogének; 1. *Lb. acidophilus* 1. törzs felülűszőjének pozíciója; 2. *Lb. acidophilus* NCAIMB 01132 felülűszőjének pozíciója, 4. *Lb. acidophilus* 3. törzs felülűszőjének pozíciója. A fekete nyilak mutatják az észlelt feltisztulási zónákat.

V. Összefoglalás

A húgyúti fertőzések a népesség jelentős hányadának jelentenek napi szintű problémát. Ezek az infekciók kevés kivétellel bakteriális kórképek, a patogének főként a normál bélflóra tagjai közül kerülnek ki. A nők anatómiai adottságaik révén (a húgycső nyílása közelebb van a végbélhez, mint a férfiaknak) könnyebben megfertőződnek, mint a férfiak, de utóbbiak körében több a komplikáció, köszönhetően a hosszabb húgycsőnek. Érdeklődésemet azért keltette fel a húgyúti infekciók vizsgálata, mert számottevő közegészségügyi probléma, amelynek kezelésében, gyógyításában minden kis előrelépés nagy segítséget jelenthet a betegeknek. Munkám során a Mátrai Gyógyintézet mikrobiológiai laboratóriumában és az Eszterházy Károly Főiskola Egerfood Regionális Tudásközpontjában végeztem el azokat a vizsgálatokat, amelyekből dolgozatom megszületett.

A bevizsgált vizeletminták 39,3 %-ában (467 pozitív / 1188 megvizsgált minta) találtunk kórokozókat, amely igen komoly számarány, kevés olyan betegség van, amely ennyire elterjedt a lakosság körében. A mikrobák azonosítása biokémiai módszerekkel történt, és a *Klebsiella* törzsek kivételével sikerült fajsztinten meghatároznom a patogén izolátumokat. Noha az azonosításnak ez a típusa robusztus és megbízható, véleményem szerint a molekuláris diagnosztika (PCR) elterjedésével egyszerűbbé (és talán költséghatékonyabbá is) lehetne tenni ezt a fajta vizsgálatot. A patogének 60 %-a *E. coli*, 18 %-a *P. mirabilis*, 13 %-a *Klebsiella* sp, 8 %-a pedig *Ent. faecalis* volt, amely jól mutatja, hogy a végbél és környéke az elsődleges szennyező forrás.

Az egyes patogének antibiotikum rezisztenciáját antibiotikum korongokkal vizsgáltuk. Az eredményeket részletesen bemutattam a 4.2 fejezetben, az összegzést pedig a 2. melléklet mutatja be. Ennek alapján megállapítottuk, hogy az általunk izolált törzsek között nem található olyan, amely az általánosan elfogadott értékekhez képest fokozott rezisztenciával rendelkezne az antibiotikumokkal szemben. Ez jó hír a betegeknek és a kezelőorvosoknak egyaránt, mivel az antibiotikum rezisztencia az utóbbi években terjedőben van és több, súlyos lefolyású betegség (pl. TBC) kezelését is megnehezíti.

A patogén kórokozónak nem csak a húgyúti fertőzések kialakulásában van szerepe, hanem nőknél a hüvely egyes megbetegedéseit is okozhatják. Az egészséges hüvelyflóra védelmi vonalát jelentős részben tejsav baktériumok, főként *Lactobacillus*ok alkotják. Ezek a fajok elsősorban szerves sav termelésük révén gátolják a patogén mikroorganizmusok elszaporodását, de számos kísérlet eredménye azt mutatja, hogy fehérje természetű

antibakteriális anyagokat, az ún. bakteriocineket is számos törzs termel. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az agardiffúziós kísérletekben a tejsav baktériumok sejtméntes felülúszója erőteljesebben gátolta a patogéneket, mint az élő sejteket tartalmazó szuszpenzió. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy az élő sejtek számára kevésbé kedvezőek voltak a növekedési feltételek az agarlemezbe fűrt lyukakba történt beoltás után, így további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy az optimális körülményeket meg tudjuk határozni. Mindazonáltal, összesen 3 olyan *Lactobacillus* törzs volt, amely gátló hatást tudott kifejteni. A tejsav baktériumok szélesztett patogén baktériumokra való leoltása értékelhetetlen eredményt adott, a patogének gyorsan túlnőtték őket, így itt is további optimalizálási lépésekre lesz szükség.

A fenti kísérletekben nem tudtuk sem megerősíteni, sem kizárni a bakteriocin fehérjék jelenlétét, ezért a későbbiekben szeretnénk ebbe az irányba is lépéseket tenni. Terveink között szerepel a bakteriocin fehérjék közvetlen kimutatása 2D SDS-gélelektroforézissel, valamint a fehérjéket kódoló gének kimutatása PCR-rel. Tervezzük továbbá újabb, hüvelyből izolált tejsav termelő baktériumok patogénekre kifejtett antagonisztikus hatásának vizsgálatát. Amennyiben sikerül olyan törzseket találnunk, amelyek eredményesen gátolják a leggyakoribb uropatogén fajokat, az megteremtheti az alapját újabb intimhigiénés készítmények létrehozásának.

Irodalomjegyzék

Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., Hultgren, S.J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**:105–107.

Dielubanza, E.J., Schaeffer, A.J. (2011). Urinary tract infections in women. *The Medical Clinics of North America* **95**:27–41.

Griebeling, T.L. (2007). Urinary tract infection in women. In: Litwin MS, Saigal CS, eds. *Urologic Diseases in America*. NIH publication **07–5512**:587–619.

Jass, J., Reid, G. (2009). Effect of cranberry drink on bacterial adhesion *in vitro* and vaginal microbiota in healthy females. *The Canadian Journal of Urology* **16**:4901-4907.

Kevin, F. (1996). Racial disparities in preterm births. *Public Health Reports* **111**:104-113.

Minardi, D., d'Anzeo, G., Cantoro, D., Conti, A., Muzzonigro, G. (2011). Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *International Journal of General Medicine* **4**:333-343.

Pallett, A., Kieran, H. (2010). Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65** Suppl 3:iii25-33.

Park, Y.S. (2012). Renal scar formation after urinary tract infection in children. *Korean Journal of Pediatrics* **55**:367-370.

Reid, G., Bruce, A.W. (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgraduate Medical Journal* **79**:428-432.

Salvatore, S., Salvatore, S., Cattoni, E., Siesto, G., Serati, M., Sorice, P., Torella, M. (2011). Urinary tract infections in women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* **156**:131–136.

Schappert, S.M., Rechtsteiner, E.A. (2008). Ambulatory medical care utilization estimates for 2006. *National Health Statistics Reports* **No 8**. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.

Sonnex, C. (1998). Influence of ovarian hormones on urogenital infection. *Sexually Transmitted Infections* **74**:11-19.

Tolkoff-Rubin, N.E., Cotran, R.S., Rubin, R.H. (2008). Urinary tract infection, pyelonephritis, and reflux nephropathy. In: Brenner BM, ed. *Brenner & Rector's The Kidney*. 8th ed. Vol. 2. 1203–1238.

Internetes hivatkozás

1: www.eucast.org/eucast_disk_diffusion_test/disk_diffusion_methodology/.hu

2: www.eucast.org/expert_rules.hu

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a Mátrai Gyógyintézet Központi Laboratóriuma minden dolgozójának, hogy lehetővé tették számomra a munkájukba történő bekapcsolódást és a kísérletek elvégzését.

Köszönöm dr. habil. Kiss Attila tanár úrnak, az EKF Élelmiszertudományi Intézet intézetvezetőjének és dr. Naár Zoltán tanár úrnak, az EKF Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék tanszékvezetőjének, hogy az Egerfood Regionális Tudásközpont mikrobiológiai laboratóriumában dolgozhattam.

Köszönöm Fejes Zsuzsannának, az Egerfood RET mikrobiológiai laboratóriuma vezetőjének, hogy segítette munkámat.

És végül, de nem utolsósorban köszönöm dr. Pál Károlynak, az EKF Élelmiszerkémiai és Biokémiai Tanszék adjunktusának a dolgozat elkészítéséhez nyújtott támogatását.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Tuza Szabina nyilatkozom, hogy a jelen dolgozatban szereplő eredmények saját munkámon alapulnak. A más forrásból származó adatokat, tényanyagot egyértelműen megjelöltem és a forrásokat az Irodalomjegyzékben feltüntettem.

Eger, 2012. december 20.

.....

Tuza Szabina

Mellékletek

1. melléklet Az API20E teszt pozitív és negatív reakcióinak összefoglalása.

Teszt	Hatóanyag	Eredmény	
		Negatív	Pozitív
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid	színtelen	sárga
ADH	L-arginin	sárga	vörös/narancs
LDC	L-lizin	sárga	vörös/narancs
ODC	L-ornitin	sárga	vörös/narancs
CIT	trinátrium-citrát	halványzöld/sárga	kékeszöld/kék
H ₂ S	Na-tioszulfát	színtelen/szürkés	fekete lerakódás/vékony vonal
URE	ureum	sárga	vörös/narancs
TDA	L-triptofán	TDA/azonnal sárga	vörösbarna
IND	L-triptofán	James/azonnal színtelen, halványzöld,sárga	rózsaszín
VP	Na-piruvát	VP1+VP2/10perc színtelen, halványrózsaszín	rózsaszín/vörös
GEL	zselatin	nincs diffúzió	fekete festék diffúzió
GLU	D-glükóz	kék/kékeszöld	sárga
MAN	D-mannit	kék/kékeszöld	sárga
INO	inozit	kék/kékeszöld	sárga
SOR	D-szorbit	kék/kékeszöld	sárga
RHA	L-ramnóz	kék/kékeszöld	sárga
SAC	D-szacharóz	kék/kékeszöld	sárga
MEL	D-melibióz	kék/kékeszöld	sárga
AMY	amigdalin	kék/kékeszöld	sárga
ARA	L-arabinóz	kék/kékeszöld	sárga

2. melléklet A patogén mikrobák törzseinek antibiotikum érzékenysége. A „●” jel azokat az antibiotikumokat jelöli, amelyekre az adott faj izolátumainak legalább 85 %-a érzékeny.

	Antibiotikum																
Patogén		AM	AMC	CAZ	CIP	CN	CRO	CTX	CXM	F	FEP	IMP	LNZ	NOR	SXT	TEC	VA
<i>E. coli</i>				●		●	●	●	●		●						
<i>Ent. faecalis</i>												●	●			●	●
<i>Klebsiella</i> sp.				●		●	●		●		●						
<i>P. mirabilis</i>				●		●	●	●	●		●						