

8. fejezet

Klinikai mikrobiológia

Írta Fodor László, Nagy Péter,
Rusvai Miklós, Soós Pál,
Vajdovich Péter, Szilágyi Attila
és Kiss Gabriella

A vizsgálatok jelentősége

A fertőző betegségek kóroktani diagnosztikájában meghatározó jelentősége van a laboratóriumi vizsgálatoknak. Bár a vizsgálatok egy része speciális laboratóriumot igényel, így erre felkészült diagnosztikai intézetben végezhető el, más részüket a kereskedelemben kapható táptalajok, reagensek, diagnosztikai készletek segítségével egy jól felszerelt laboratóriumban is elvégezheti az állatorvos.

A következőkben részletesen bemutatjuk a klinikusok által is alkalmazott eljárásokat, míg a csak diagnosztikai intézetekben végezhető vizsgálatokról csupán tájékoztató, rövid összefoglalást adunk.

A diagnosztikai eljárások az alábbi tématerületeket foglalják magukban:

- bakteriológiai diagnosztika,
- bakteriológiai vizsgálatok a lovak szaporodásbiológiai diagnosztikájában,
- virológiai diagnosztika,
- immundiagnosztika,
- immunológiai rutinvizsgálatok a kisállatgyógyászatban,
- a gombás betegségek laboratóriumi diagnosztikája.

A hagyományoknak megfelelően együtt tárgyaljuk a baktériumok, a vírusok és a gombák okozta betegségek laboratóriumi diagnosztikáját, míg a parazitás betegségeket külön fejezetben ismertetjük (☛ PARAZITOLÓGIAI VIZSGÁLATOK, 349. o.).

Bakteriológiai diagnosztika

A vizsgálatokról általában

A baktériumok kiváltotta megbetegedések okát (okait) bakteriológiai diagnosztikai vizsgálatokkal tárjuk fel. A szakszerűen vett mintából az adott megbetegedésért felelős kórokozókat kitenyésztjük, meghatározzuk a tulajdonságaikat és azonosítjuk. A vizsgálatok célja, hogy segítse a gyógykezelést végző állatorvost az adott megbetegedés minél eredményesebb leküzdésében: a leghatásosabb (célzott) antibakteriális terápia kiválasztásában, a megelőző és védekező intézkedések megtételében.

A vizsgálatok egy része elvégezhető a gyakorló állatorvos megfelelően felszerelt laboratóriumában (rendelőjében), de a bonyolultabb vagy különleges felszerelést igénylő munkákat célszerűbb az állategészségügyi diagnosztikai hálózat laboratóriumaira bízni.

A BAKTERIOLÓGIAI LABORATÓRIUM ÉS FELSZERELÉSE

A bakteriológiai vizsgálatokra egy olyan elkülönített laboratórium alkalmas, ahol biztosíthatók a munkához szükséges steril körülmények, kicsi a kontamináció veszélye, az asztalfelület jól fertőtleníthető, s a vizsgálatokhoz megfelelő a természetes megvilágítás.

Műszerek/készülékek: 50 és 100 kPa túlnyomáson működő autokláv (a táptalajok és az eszközök sterilizálására), hőlégszokrény (villansütő), termosztát, hűtőszokrény, mikroszkóp (immerziós objektívvel felszerelt, sötétlátóteres vizsgálatokra is alkalmas).

Eszközök: üveg vagy gyárilag sterilizált műanyag Petri-csészék, kémcsövek, Wassermann-csövek, lombikok, főzőpoharak, tárgylemezek, fedőlemezek, oltókacsok.

Anyagok: vegyszerek, táptalajok (készen, ill. Petri-csészékbe kiöntött formában is kaphatók).

A mintavétel

A mintáról általában

A mintavételnek a tenyészteni kívánt legigényesebb baktérium életfeltételeihez kell igazodnia. Bakteriológiai vizsgálatra az élő állatból származó különféle klinikai minták, váladékok alkalmasak, így pl. orrváladék, méh- és hüvelyváladék, tej, vizelet, bélsár, bőrkaparék, tályog, sipolyváladék.

Nagyon fontos, hogy a mintavételt megelőzően a mintavételi hely környékét megtisztítsuk és fertőtlenítsük a kontamináció lehetőségének csökkentésére.

A folyékony vagy pépes vizsgálati mintákat száraz vagy élettani NaCl-oldattal enyhén megnedvesített, steril bakteriológiai tamponnal gyűjtjük.

Az elhullott állatból minél előbb kell mintát gyűjteni, mielőtt a bélflóra baktériumai elárasztják a szervezetet.

Szervminták esetében a szerv felszínének leégetése után steril bakteriológiai kaccsal behatolunk a szerv állományába, és annak több pontjáról veszünk mintát. A legjobb eséllyel az elváltozás határáról lehet a baktériumokat kitenyészteni.

Az állatorvosi gyakorlatban kevésbé terjedt el a hemokultúra használata, amikor a beteg állatból levett vért azonnal a kereskedelmi forgalomban kapható hemokultúra-palackba oltjuk.

A minta tárolása, szállítása

A mintavétel után a tampont – a minta kiszáradásának megakadályozására – 1-2 ml élettani NaCl-oldatot vagy élettani NaCl-oldat és glicerin azonos arányú keverékét tartalmazó kémcsőbe helyezzük. A mintákat hűtve (hűtőtáskában, jégakkumulátorral) célszerű a laboratóriumba szállítani.

Az elhullott állatból származó mintát külön csomagolva, a keresztfertőzéseket megelőzve kell a laboratóriumba küldeni.

Ha igényes – különösen, ha oxigénre érzékeny – baktériumok izolálása a cél, akkor saját összeállítású vagy a kereskedelmi forgalomban tamponnal együtt kapható szállító táptalajokat kell alkalmaznunk. A tampont egy modulattal helyezzük a szállító táptalajba, hogy annak oxigéntelítődését megelőzzük. A szállító táptalajok kis redoxipotenciálú, tápanyagokban szegény táptalajok, amelyek elősegítik, hogy a baktérium élő állapotban kerüljön a vizsgáló laboratóriumba.

Egyes érzékeny baktériumok (pl. *Moraxella bovis*) sikeresebben tenyésztethetők, ha a tamponon lévő mintát a mintavételi helyszínen táptalaj felületére oltjuk, s az így beoltott táptalajokat a laboratóriumba érve rögtön termosztátba helyezzük.

Hibaforrás. Szállító táptalajok használatakor különös gondot kell fordítani a táptalajok tárolására és felhasználhatósági idejére, mivel e táptalajok redoxipotenciálja a tárolás során kedvezőtlenül nő.

A minta és baktériumtörzs más laboratóriumba küldése

Számos megbetegedés esetében várható, hogy a szóba jöhető baktériumok izolálása a baktérium különleges igényei miatt meghaladja az adott laboratórium lehetőségeit. Ilyenkor a minta vizsgálatát más laboratóriumra, diagnosztikai intézetre bízunk.

Hasonlóképpen, ha egy elváltozásból olyan baktériumot tenyésztünk ki (☉ 298. o.), amelynek az azonosítása meghaladja lehetőségeinket, célszerű a törzset a körelőzményi adatokkal (állatfaj, a megbetegedés jellege, az elvégzett bakteriológiai vizsgálatok, a baktérium kitenyésztesének körülményei stb.) együtt diagnosztikai intézetbe küldeni.

Az elküldendő törzset legjobb gumidugóval lezárt kémcsőbe öntött ferdeagar felületére, levestáptalajba vagy lágyagarba oltva elküldeni. Petri-csészére

oltott törzset is eljuttathatunk, ha gondoskodunk arról, hogy a szállítás során a táptalaj ne száradjon ki.

A baktériumtörzs szállításakor figyelemmel kell lenni arra, hogy a szállítóedény törése esetén a baktérium ne juthasson ki, megbetegedést ne okozhasson.

A BAKTÉRIUMOK AZONOSÍTÁSA – A BAKTÉRIUMNEMZETSÉG ÉS A NEMZETSÉGEN BELÜLI FAJOK MEGHATÁROZÁSA

Bevezető A bakteriológiai diagnosztikai vizsgálat során a laboratóriumba érkezett mintából közvetlen mikroszkópos vizsgálatot és baktériumtenyésztést végzünk.

A baktériumok azonosítása során először meghatározzuk a baktérium alakí, tenyésztési, biokémiai és szerológiai tulajdonságait, majd a megismert tulajdonságokat összehasonlítjuk az ismert baktériumok tulajdonságaival. Az összehasonlítást *baktériumhatározók* segítik, amelyek alapelve az, hogy bizonyos sajátosságok meghatározása (elsődleges próbák) alapján kijelölik a baktérium azonosításának irányát, majd javasolják, hogy a pontosabb meghatározáshoz milyen másodlagos próbákat kell elvégezni:

- elsődleges próbák – a baktériumnemzetség meghatározása
 - ◆ mikroszkópos vizsgálatok natív állapotban és festett készítményben,
 - ◆ egyszerű biokémiai vizsgálatok (katalázpróba, oxidázpróba, oxidatív-fermentatív próba;
- másodlagos próbák – a baktériumnemzetségen belüli fajok meghatározása (háromcsőpróba, enzimmutatások, mikrotesztek).

A BAKTÉRIUMOK TENYÉSZTÉSE

A vizsgálat előkészítése

A vizsgált mintában lévő baktériumok akkor tenyészthetők ki, ha biztosítjuk a baktériumok életfeltételeit (víz, tápanyagok, optimális kémhatású, ozmotikus nyomású és hőmérsékletű közeg, megfelelő mennyiségű oxigén).

A táptalajok és készítésük. A baktériumok tenyésztésére különböző, a tenyésztési kívánt baktérium igényeinek megfelelő táptalajokat használunk. Általános baktériumtenyésztési célra igénytelen baktériumok esetében a leggyakoribb a közönséges húsleves- és a közönséges agartáptalaj, az igényesebb baktériumok tenyésztésére a véresagar vagy a csokoládéagar.

Várhatóan többféle baktériumot tartalmazó minta esetében olyan, a célnak megfelelően kiválasztott szelektív táptalajokra oltunk, amelyek eltérő festék-, só- vagy antibiotikum-tartalmuknál fogva gátolják a nem kívánt baktériumok szaporodását. E minták vizsgálatához érdemes differenciáló táptalajokat is oltani, amelyeken különbséget tudunk tenni az egyes, különböző tulajdonságú baktériumok között.

A táptalajokat táptalajreceptek alapján vagy a kereskedelmi forgalomban kapható portáptalajokból magunk állíthatjuk elő, vagy a kereskedelemben forgalmazott kész táptalajokkal dolgozunk. A kisebb, de viszonylag széles körű vizsgálatokat végző, így többféle táptalajt igénylő laboratóriumok számára elsősorban a portáptalajok ajánlhatók, amelyekből nagyon egyszerűen lehet jó, egyenletes minőségű táptalajt előállítani.

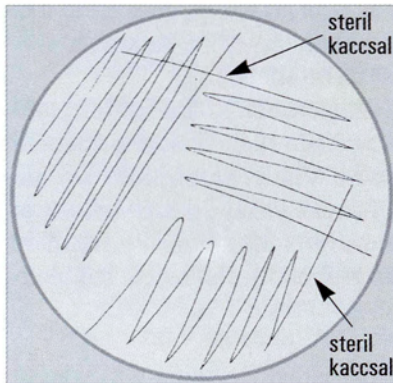
- **Portáptalajok.** A portáptalajt a leírás szerinti mennyiségben desztillált vízben feloldjuk, és felfőzzük. A kész táptalajt lombikokba vagy kémcsövekbe adagoljuk, sterilizáljuk, és jól lezárjuk. Az így készített táptalaj szobahőmérsékleten néhány hétig, vagy hűtőszekrényben több hétig minőségromlás nélkül tárolható.
- **Levestáptalaj.** Közönséges húslevest használunk, de készíthetjük 10% steril vérsavóval dúsítva is.
- **Agartáptalajok.** A korábban készített agartáptalajokat vízfürdőn való felolvasztás után, a frissen elkészülteket pedig a sterilizálást követően vízfürdőben kb. 50–55 °C-ra hűtjük, majd igény szerint steril, hőérzékeny kiegészítő anyagokat (cukrok, antibiotikumok, vér, vérsavó stb.) adunk hozzá, és Petri-csészébe öntve szobahőmérsékleten hagyjuk megszilárdulni. Felhasználás előtt a felületét termosztátban – kissé megnyitott fedéllel – 10–15 percen át szárítjuk.
 - ◆ **Véresagar** készítésekor 5–10% steril defibrinált vért (juh-, marha- vagy lóvért) adunk a táptalajhoz.
 - ◆ **Csokoládéagar** készítésekor hasonló módon járunk el, de a vér hozzáadása után a táptalajt ismét felmelegítjük kb. 80–85 °C-ra (a vörösvérsejtek szétesésnek). A táptalajt Petri-csészébe adagoljuk.
 - ◆ **Szelektív táptalajok.** A mintától és a kitenyésztetni kívánt baktériumtól függően különböző szelektív és differenciáló táptalajokat is alkalmazunk, így Edwards-agarra (Streptococcusok, Enterococcusok), sósmanit-agarra (Staphylococcusok), Drigalski-, MacConkey-, dezoxi-kolálcitrát- (Enterobaktériumok) vagy különféle antibiotikumokat tartalmazó (Brucellák, Bordetellák, Campylobacterek stb.) táptalajok felületére szélesztünk a mintából.

A minták táptalajra oltása – színtenyészet készítése. A baktériumok tenyésztéséhez a mintákat a tenyésztendő baktériumoknak megfelelően kiválasztott táptalajokra oltjuk (8.1. táblázat).

Folyékony vagy lágy mintákból (tej, vizelet, váladékok, genny, bélsár stb.) egy bakteriológiai kaccsal felvehető mennyiséget oltunk ki. A tamponmintákat a tamponnal oltjuk a táptalajra, majd ezt a kioltást szélesztjük steril kaccsal. A baktériumok azonosításához színtenyészetet kell előállítanunk.

	Közönséges agar	Véresagar agar	Csokoládé-agar (dajka-tenyésztettel)	Enterobacterium-szelektív táptalaj	Salmonella-dúsító	Anaerob véresagar
Béltartalom, bélsár	+	-	-	+	+	+
Kötőhártya-tampon	-	+	+	-	-	-
Lép	-	+	-	-	-	+
Magzat	+	+	+	+	-	+
Máj	-	+	-	-	-	+
Méhváladék	+	+	+	+	-	+
Öndó	-	+	+	+	-	-
Orrtampon	-	+	+	+	-	-
Tályog	+	+	-	-	-	+
Tej	+	+	-	+	-	-
Tüdő	-	+	+	-	-	-
Vese	-	+	-	-	-	+
Vizelet	+	+	-	+	-	-

8.1. táblázat.
A különféle minták
leoltására javasolt
táptalajok



8.1. ábra.
Oltás szilárd táptalajra

Színtenyészet készítése. A mintát a táptalaj felületének egy részére kigyóvonalban felkenjük, majd a kacsot leégetve (sterilizálva) erről a kioltási vonalról szélesztjük a vizsgálati anyagot. Az eljárást 3–4-szer megismételve gyakorlatilag hígítjuk a felvitt mintát (8.1. ábra).

A táptalaj inkubálása után a további vizsgálatokhoz önálló telepeket veszünk le bakteriológiai kaccsal, s ezeket az előbbieken leírt módon, három egymást követő alkalommal táptalajra oltjuk.

Az így nyert tenyészet a további azonosítási vizsgálatokra alkalmas színtenyészetnek minősíthető. Színtenyészet készítésére csak gátlóanyagot nem tartalmazó táptalajok alkalmasak.

Homogén tenyészet előállítása. Olyan klinikai minták esetében, ahol gyors diagnózisra van szükség, a gyakorlati igényeket a legtöbb esetben kielégíti, ha egyszeri átoltással a további vizsgálatokra alkalmas homogén tenyészetet állítunk elő. Hemokultúrából 5–7 nap tenyésztés után véresagar, csokoládéagar és anaerob agar felületére oltva tenyésztjük ki a baktériumokat.

ELSŐDLEGES PRÓBÁK – MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK

A vizsgálat menete

A mikroszkópos vizsgálatok során a baktériumok alakjáról, mozgásáról, festődési tulajdonságairól, ill. egyéb morfológiai sajátosságairól (spóráképzés, buroktermelés stb.) gyűjthetünk a baktériumok azonosításához felhasználható adatokat. Mivel a gyakorló állatorvos egyszerű fénymikroszkópos, esetleg sötétlátóteres vizsgálatokat tud végezni, a speciális eszközöket vagy eljárásokat igénylő módszereket (fáziskontraszt-mikroszkóppal végzett vizsgálatok, fluoreszcenciás és elektronmikroszkópos vizsgálatok stb.) nem ismertetjük.

A baktériumok alaki tulajdonságait legegyszerűbben két módon vizsgálhatjuk: natív és festett készítményben.

A baktériumok vizsgálata natív állapotban. A natív állapotban való vizsgálat előnye, hogy a baktériumok morfológiája minden kezelés nélkül tanulmányozható és egyúttal a baktériumok mozgása is vizsgálható.

- *Vizsgálat nedveskamra-készítményben.* A baktériumok natív állapotban így tekinthetők meg legegyszerűbben. Egy csepp baktériumsuszpenziót vagy levestenyészetet fedőlemezzel lefedünk, és erre cseppentjük az immerziós olajat. A mikroszkópos vizsgálatot sötétlátóteres, immerziós objektívvel felszerelt mikroszkópban végezzük.
- *Vizsgálat tusfestés alkalmazásával.* Egy csepp baktériumsuszpenzióhoz egy csepp finom szemcséjű tust keverünk, fedőlemezzel lefedjük, majd fénymikroszkópban immerziós lencsével vizsgáljuk. Sötétlátóteres objektív hiányában ezt a módszert követjük.

A baktériumok vizsgálata festett készítményekben. Közöséges fénymikroszkóp alkalmazásával a baktériumok morfológiai tulajdonságait legcélszerűbben festett készítményekben vizsgálhatjuk. A baktériumok festéséhez a baktériumok tenyészetéből vagy a megbetegedett állatból származó váladékokból kenetet, ill. az elhullott állatok kóros elváltozást mutató szerveiből lenyomati mintát készítünk.

Kenetkészítés. A baktérium levestenyészetének vagy a váladéknak egy cseppjét tárgylemezen elosztatjuk. Eljárhatunk úgy is, hogy tárgylemezre egy csepp élettani NaCl-oldatot cseppentünk, ebben szuszpendáljuk a baktérium agartenyészetéből levett egy kacsnyi mennyiségét, és a szuszpenziót terítjük el. Szobahőmérsékleten való szárítás után a kenetet láng feletti óvatos áthúzással fixáljuk.

Festés. A baktériumok alakjának, méretének, elhelyezkedésének vizsgálatára az egyszerű festési eljárások is alkalmasak, a baktériumok azonosításához azonban megfelelőbbek az összetett festési eljárások.

- *Egyszerű festési eljárások.* A kenetre 0,1-0,5%-os - gyógyszerárban készen is kapható - fukszin-, metilénkék-, gencianaibolya-, szafranin-, toluidin-kék- stb. oldatot rétegzünk párnaszerűen 1-3 percre. A festék behatolását a festékhez adott 3-5% fenollal fokozhatjuk. A kenetet a festék leöntése és csapvízzel való leöblítése után itatóspapír között megszáritjuk.

- **Összetett festési eljárások.** A gyakorlatban általában a Gram-festést és a Ziehl-Neelsen-féle festési eljárást használjuk, az egyéb összetett festési eljárások (Köster-, Stamp-, Vágó-, Giemsa-féle stb. festés) inkább csak egy-egy baktériumnemzetség láthatóvá tételére alkalmasak.
- ◆ **Gram-festés.** A kenetet 0,2–0,4%-os gencianaibolya-oldattal festjük 3–5 percre, majd ennek leöntése után Lugol-oldattal festünk 1–1,5 percen át. A Lugol-oldat eltávolítása után néhány csepp 96%-os etanollal kivonást végzünk. Ezután vízzel leöblítjük a kenetet, majd 0,1–0,2%-os vizes fukszin- vagy szafraninoldattal 1 percre festjük, és megszártjuk itatóspapír között. A Gram-pozitív baktériumok kék, míg a Gram-negatívak piros színben tűnnek fel, bár egyes nemzetségeknél jellemző az átmeneti szín.
- ◆ **Ziehl-Neelsen-féle festés.** A kenetre rétegzett 1%-os fukszinoldatot háromszor gőzölésig melegítjük, ezután a készítményt 5–10 csepp 5%-os kénsavoldattal, majd 96%-os etanollal kivonjuk. Vizes öblítést követően metilénkékoldattal festjük meg a nem sav- és alkoholálló baktériumokat. A módszerrel tehát a baktériumok sav- és alkoholállósága vizsgálható. A Ziehl-Neelsen-pozitív baktériumok piros, a negatívak pedig kék színűek lesznek.

A megfestett, száraz kenetekre immerziós olajat cseppentünk, és immerziós lencsével felszerelt mikroszkópban vizsgáljuk.

ELSŐDLEGES PRÓBÁK – EGYSZERŰ BOKÉMIAI VIZSGÁLATOK

Az egyszerű biokémiai vizsgálatok során leggyakrabban a kataláz-, az oxidáz- és az oxidatív-fermentatív próbát végezzük el.

Katalázpróba. A kataláz enzimet több módon is kimutathatjuk. Legegyszerűbb, ha a tárgylemezre cseppentett 3%-os hidrogén-peroxid-oldatba egy kacsnyi baktériumtenyészetet teszünk. Ügyeljünk arra, hogy a tenyészet gyűjtésekor táptalajdarabot ne vegyünk fel, ugyanis a táptalaj vastartalma téves pozitív eredményt adhat. Kataláz jelenlétében pozitív a reakció, amit a hidrogén-peroxidból gyorsan képződő oxigénbuborékok jeleznek. Kataláz hiányában negatív a próba: a buborékképződés elmarad.

Oxidázpróba. A baktériumok által termelt citokróm-oxidáz enzim kimutatásakor 1%-os tetrametil-*p*-fenilén-diamin-oldattal megnedvesített szűrőpapírra műanyag kaccsal vagy steril hurkapálcával baktériumtenyészetet teszünk. A tenyészet alatt és körül a szűrőpapír azonnal kék színű lesz. A próba érzékenyen jelzi az enzim termelődését.

Oxidatív-fermentatív próba. A próbával azt vizsgáljuk, hogy a baktérium a glükózt oxidáció vagy fermentáció útján bontja-e, vagy egyáltalán nem bontja. A vizsgálathoz két, glükózt és általában brómtimolkék-indikátort tartalmazó félfolyékony táptalajt használunk. Az egyiket előzetesen forralással oxigénmentesítjük és beoltjuk, majd ráöntött paraffinolajjal vagy olvasztott paraffinnal lefedjük. A másikat egyszerűen csak beoltjuk, és fedetlenül

hagyjuk. 14 napon át tenyésztjük a baktériumokat az oxidatív-fermentatív táptalajban. A próbát minden nap elbíráljuk:

- a baktérium oxidatív, ha a le nem fedett cső felső részén jelzi csak az indikátor a glükózbontást;
- a baktérium fermentatív, ha a paraffinnal lefedett csőben és a le nem fedett cső alsó részében van glükózbontás;
- a glükózt nem bontó fajok esetében a táptalajon színváltozást nem látunk, vagy enyhén lúgos irányba való eltolódást tapasztalunk.

A próba során megfigyelhetjük azt is, hogy a baktérium milyen módon nő: aerob vagy anaerob körülmények között:

- a baktérium aerob módon (oxigén jelenlétében) nő, ha a le nem fedett cső felső részén látunk baktériumszaporodást;
- a baktérium anaerob módon (oxigén hiányában) szaporodik, ha a lefedett csőben, valamint a le nem fedett cső alsó részén van növekedés;
- amennyiben mind oxigén jelenlétében, mind pedig annak hiányában szaporodik a baktérium, a faj aerob-fakultatív anaerob.

MÁSODLAGOS PRÓBÁK

A baktériumnemzetségeken belüli fajok elkülönítésére másodlagos próbákat használunk. Az egyes nemzetségekhez megfelelő próbák megválasztásához a baktériumhatározó kézikönyvek nyújtanak segítséget. A másodlagos próbákkal vizsgáljuk például, hogy az adott baktérium

- milyen szénhidrátokat bont;
- a glükózból mit termel: nagy mennyiségű savat vagy acetoint (metilvörös- és Voges-Proskauer-próba);
- bontja-e a tejcukrot (tejalvasztás);
- redukálja-e a nitrátokat;
- termel-e dihidrogén-szulfidot (H_2S), indolt;
- milyen enzimeket termel: ureázt, fenil-alanin-dezaminázt vagy aminosav-dekarboxilázokat.

A másodlagos próbákhoz szükséges táptalajok előállításának és a próbák elvégzésének részletei a bakteriológiai diagnosztikai kézikönyvekben megtalálhatók.

Háromcsőpróba. Kevésbé igényes baktériumok esetében gyorsdiagnosztikai célra jó eredménnyel használható az ún. háromcsőpróba.

1. cső: urea-indol táptalaj

- a táptalaj kémhatásának lúgos irányú megváltozása ureáz enzim jelenlétére utal,
- a táptalajhoz adott Kovács-reagens pirossá válása pedig indol triptofánból való termelését jelzi;

2. cső: mannitos lágyagar táptalaj

- a táptalajban lévő fenolvörös-indikátor sárga színe a mannitbontást mutatja,

- a baktériumok diffúz növekedése csillók jelenlétét, az oltási csatornára korlátozódó növekedése pedig a csillók hiányát jelzi;

3. cső: magasagarra öntött ferdeagar táptalaj

- a táptalaj alsó, magasagart tartalmazó részének a savas kémhatás irányába való elváltozása glükózbontást, a táptalaj felső, ferdeagart tartalmazó részének savi változása pedig laktózbontást mutat,
- a táptalaj fekete elszíneződése a H₂S-termelést jelzi,
- a táptalajban gázbuborékok megjelenése a szénhidrátokból képződött gázok termelésére utal.

Enzimkimutatás. A baktériumfajok azonosításához különféle, a baktériumok által termelt enzimeket is kimutatunk. Diagnosztikai célú vizsgálatok esetében gyakori a koaguláz kimutatása:

- steril nyúlplazmát oltunk a vizsgálandó törzssel, majd néhány órán át inkubáljuk. A plazma megszilárdulása a koaguláz termelését jelzi;
- a baktériumot tárgylemezre cseppentett, 1:10 arányban hígított nyúlplazmába szuszpendáljuk. Ha a szuszpenzió készítése során fibrinszálak válnak ki, koaguláz van jelen.

Mikrotesztek. A baktériumok biokémiai tulajdonságainak gyors vizsgálatára és azonosítására számos cég hoz forgalomba liofilizált táptalajokat tartalmazó mikroteszteket. A vizsgálandó baktériummal való beoltás és tenyésztés után leolvassuk az eredményt.

Értékelés

☺ ☹ A baktériumnemzetség az elsődleges próbák során megismert tulajdonságok alapján meghatározható, ill. rokon nemzetségek esetében behatárolható, hogy a vizsgált baktérium melyik nemzetségbe tartozik. A másodlagos próbák eredményei alapján az is eldönthető, hogy a baktérium az adott nemzetségen belül melyik fajhoz tartozik.

Az állatorvosi bakteriológiai diagnosztikai munka során előforduló fontosabb baktériumnemzetségek jellemzőinek rövid összefoglalásával a baktériumok azonosításához adunk útmutatást (de nem említjük azokat a baktériumnemzetségeket, amelyek tenyésztése különleges felkészültséget vagy eszközöket igényel), valamint azokat, amelyek csak ritkán fordulnak elő a vizsgálati mintában (*Dermatophilus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Taylorella*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Arcobacter* nemzetségek, spirochaeták, chlamydiák, rickettsiák, mycoplasmák). Ezek kimutatását speciális diagnosztikai laboratóriumra kell hagyni.

Az eredmények értékelésénél a klinikai, a kórbonctani és a bakteriológiai eredmények alapján mérlegelni kell, hogy az izolált baktériumoknak van-e kórtani jelentőségük, vagy pedig az állatok nyálkahártyáján, bélrendszerében, bőrén stb. jelen lévő normál bélflórából származnak-e.

Baktérium-nemzetség	Alak	Savállóság	Spóra	Mozgás	Aerob	Anaerob	Kataláz	Oxidáz	Glükóz	OF-teszt
Micrococcus	G	-	-	-	+	-	+	-	+/-	O/-
Staphylococcus	G	-	-	-	+	+	+	-	+	F
Enterococcus	G	-	-	-/+	+	+	-	-	+	F
Streptococcus	G	-	-	-	+	+	-	-	+	F
Corynebacterium	P	-	-	-	+	+	+	-	+/-	F/-
Rhodococcus	P/G	Gy	-	-	+	-	+	-	-	-
Listeria	P	-	-	+	+	+	+	-	+	F
Erysipelothrix	P	-	-	-	+	+	-	-	+	F
Lactobacillus	P	-	-	-	+	+	-	-	+	F
Actinomyces	P	-	-	-	-/+	+	-	-	+	F
Clostridium	P	-	+	+/-	-	+	-	-	+/-	F/-
Bacillus	P	-	+	+/-	+	-/+	+	-	+/-	O/-
Nocardia	P	Gy	-	-	+	-	+	-	+	O
Mycobacterium	P	+	-	-	+	-	+	-	+	O

8.2. táblázat.
A fontosabb
állatpatogén Gram-
pozitív baktérium-
nemzetségek

Jelmagyarázat:
P pálca alakú;
G gömb alakú;
Gy gyenge;
O oxidatív;
F fermentatív;
+ a törzsek több,
mint 85%-a
pozitív;
- a törzsek több,
mint 85%-a
negatív.

Gram-pozitív baktériumnemzetségek (8.2. táblázat)

Micrococcus. Elsősorban nyálkahártyákról tenyésztendő, jellegzetes krémszínű, sárga, narancs vagy piros, csak a telepeket elszínező pigmenteket termelő szaprofita baktériumok, amelyeket a Staphylococcus törzsektől kell elkülöníteni.

Staphylococcus. Bőrről, helyi gennyeseződésekből, tőgygyulladásos esetekből, nyálkahártyákról, bélből kitenyésztendő, arany, sárga és fehér, a táptalajba nem diffundáló pigmenteket termelő fajok. A patogén fajok többnyire koagulázt, hemolizineket, valamint egyéb enzimeket és toxinokat termelnek, bár tőgygyulladást és bőrgyulladást koagulázt nem termelő fajok is okozhatnak.

Enterococcus. Bélben élő, szaprofitának tekintett baktériumok, amelyek szórványosan helyi gennyeseződést és különböző megbetegedéseket okozhatnak. A streptococcusok kitenyésztésére használt Edwards-agaron is szaporodnak. Epetűrésük, tág hőmérsékleti határok közötti szaporodásuk, szénhidrátbontásuk, valamint relatív hőűrésük alapján elkülöníthetők a streptococcusoktól.

Streptococcus. Állatok különféle helyi gennyeseződéseiből, fiatal állatok általános megbetegedéseiből, bőrgyulladásokból, tőgygyulladásból élesztőkivonatot is tartalmazó véresagaron kitenyésztendő baktériumok, amelyek gyakran izolálhatók a nyálkahártyákról és a bőrről is. Izolálásukat a 10% CO₂-ot tartalmazó légkör elősegíti, vegyes mintákból Edwards-agarra oltva szelektíven kitenyésztendők. Lenyomati készítményekben, váladékokból és levestenyészetekből készült kenetekben láncokat képeznek. Biokémiai

tulajdonságaik, a hemolízis típusa (α , β , nincs hemolízis) és a sejtfalban lévő kivonatantigének alapján csoportosíthatók.

Corynebacterium. Különböző helyi gennyesedésekből, ízületgyulladásból, méhgyulladásból, tőgygyulladásból, tüdőgyulladásból, bőrgyulladásból, nyirokcsomó-gyulladásból véresagaron 48–72 óra alatt kitenyészthető, száraz, gyakran krémszínű vagy fehér telepeket képező baktériumok. Egyes fajok hemolizálnak, a fajok azonosítása meglehetősen nehéz.

Rhodococcus. Állatorvosi szempontból fontos faja a *R. equi*, amely nagy, rózsaszínű, nyálkás telepei révén könnyen felismerhető.

Listeria. Vetélt szarvasmarha-, nyúl- és juhmagzatokból, juh agyvelőgyulladásából vagy különböző egészséges állatok bélcsatornájából közönséges agaron is kitenyészthető baktériumok, 4–42 °C hőmérsékleten izolálhatók. Csillót csak szobahőmérsékleten képeznek, hemolizálnak. Szelektív dústításukhoz a mintát levestáptalajba oltjuk, majd hűtőszekrényben tenyésztjük.

Erysipelothrix. Sertésorbáncban elhullott sertés, vérfertőzés miatt elhullott madarak parenchymás szerveiből közönséges vagy véresagaron 24–48 óra alatt kitenyészthetők. Jellegzetesen apró, áttetsző telepeket képeznek, amelyek hosszabb tenyésztési idő után sem lesznek nagyobbak. Kenetben önálló vagy láncba rendeződő karcsú pálcákként mutatkoznak.

Lactobacillus. A száj, a bél és a nemi nyálkahártyák szaprofita lakói, amelyek néha vérfertőzést okozhatnak. Csökkentett O_2 -t és megnövelt CO_2 -ot tartalmazó légkörben lehet kitenyészteni savas kémhatású táptalajon.

Actinomyces. Állatok különböző gennyes megbetegedéseiből anaerob vagy mikroaerofil körülmények között kitenyészthető baktériumok. Az *A. pyogenes* levegőn is jól tenyészthető.

Clostridium. Háziállatok bélcsatornájából és különféle beteg szerveiből anaerob viszonyok között kitenyészthető baktériumok. A fiatal tenyészetek Gram-pozitívak, később azonban Gram-negatívvá válhatnak. A spóráképződésnek több feltétele van, így a spórák hiánya még nem zárja ki a clostridiumok izolálását. A clostridiumok a buroktermelő *C. perfringens* törzsek kivételével jellegzetes lapos, szabálytalan, egyenetlen szélű, hemolizáló telepeket képeznek. A fajok pontos meghatározása a fermentációs végtermékek gázkromatográfiás azonosításán alapul (speciálisan felszerelt laboratóriumot igényel). Klinikai mintákból kitenyésztett clostridiumokat jó eredménnyel azonosíthatunk toxinneutralizációs próbával.

Bacillus. Bacillusokat bőrről, nyálkahártyákról közönséges vagy véresagaron tenyészthetünk ki. Kivétel ez alól a nemzetség egyetlen állatpatogén tagja, a *B. anthracis*. A bacillusok telepei nagyok, jellegzetes lehet a buroktermelésük vagy egyes fajok hemolízise. Gyakran rosszul festődnek Gram-festéssel, a *B. anthracis* kivételével mozognak. A *B. anthracis* 10–15% CO_2 jelenlétében burkot képez, ennek hiányában telepei 3–4 mm átmérőjű száraz, lapos telepek. Számos szaprofita *Bacillus* faj levegőn is tud burkot termelni, spórásodásukhoz különböző feltételeket igényelnek.

Nocardia. Főként szaprofiták, néha azonban fakultatív patogén fajokként állatok bőréről, alkalmanként szarvasmarha tőgygyulladásából, húsevők mellhártyagyulladásából is izolálhatók. Közönséges agaron is jól szaporodnak, jellegzetes a krémszínű, rózsaszín vagy narancssárga pigmentjük. A mikroszkópos képben Gram-festéssel nem mindig jól festődő, néha saválló, elágazó fonalakat látunk.

Mycobacterium. Tenyésztésüket és azonosításukat speciális táptalajigényük, hosszú tenyésztési idejük és különleges állategészségügyi, valamint közegészségügyi jelentőségük miatt erre a célra létrehozott laboratóriumok végzik.

Gram-negatív baktériumok (8.3. táblázat)

Moraxella. Kötőhártyáról és felső légutakból véresagaron tenyészthetők ki, az 1–2 mm átmérőjű szürke, a táptalajba süppedő telepeket széles hemolízises gyűrű veszi körül.

Brucella. Élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon 10–15% CO₂ jelenlétében 4–5 nap alatt tenyészthetők ki. Fontos humán- és állategészségügyi jelentőségük miatt tenyésztésük és azonosításuk a diagnosztikai laboratóriumok feladata.

Bordetella. Különféle állatok felső légutainak nyálkahártyájáról közönséges agaron 48 óra inkubálással tenyészthetők ki. Penicillint és nitrofurantoint tartalmazó MacConkey-agaron szelektíven izolálhatók.

Pseudomonas. Különféle állatok nyálkahártyáiról, bőréről, tejéből, alkalmanként helyi gennyeseidéből tenyészthetők ki közönséges agaron. A fajok többsége a telepek környékét elszínező pigmentet termel.

Actinobacillus. A száj nyálkahártyájáról, a megbetegedett állatok különféle szerveiből izolálhatók. Élesztőkivonatot tartalmazó véresagaron kb. 2 mm

Baktérium-nemzetség	Alak	Mozgás	Aerob	Anaerob	Kataláz	Oxidáz	Glükóz	OF-teszt
Moraxella	P/G	-	+	-	+	+	-	-
Brucella	P	-	+	-	+	+	+	O
Bordetella	P	+	+	-	+	+	-	-
Pseudomonas	P	+	+	-	+	+	+	O
Actinobacillus	P	-	+	+	+	+	+	F
Pasteurella	P	-	+	+	+	+	+	F
Aeromonas	P	+	+	+	+	+	+	F
Vibrio	P	+	+	+	+	+	+	F
Enterobacteriaceae	P	+/-	+	+	+	-	+	F
Haemophilus	P	-	+	+	+/-	+/-	+/-	F
Campylobacter	P	+	-	-	+/-	+	-	-

8.3. táblázat. A fontosabb állatpatogén Gram-negatív baktérium-nemzetségek

Jelmagyarázat:
 P pálcá alakú;
 O oxidatív;
 F fermentatív;
 + a törzsek több, mint 85%-a pozitív;
 - a törzsek több, mint 85%-a negatív.

átmérőjű, alkalmanként a táptalajhoz tapadó, nyúlós telepek formájában nőnek.

Pasteurella. Különbéféle háziállatok felső légutaiból, tüdőgyulladásos eseteiből, ill. vérfertőzés esetén a parenchymás szervekből izolálhatók. Véresagaron erősen nyálkás vagy szabályos S telepeket képeznek.

Aeromonas. Leggyakrabban állatok bélcsatornájából tenyésztethetők ki. Melegvérű állatokban nem patogének, az enterobaktériumoktól kell elkülöníteni őket.

Vibrio. Főként vízi állatokból izolálható, hajlott pálcák. Néha madarak megbetegedése kapcsán fordulnak elő. Szelektív tenyésztésükre erősen lúgos (pH = 8,6) táptalajt használunk.

8.4. táblázat.

A főbb Enterobacteriaceae nemzetségek elkülönítése

Nemzetségek	Indol	Ureáz	Laktóz	Mannit	H ₂ S	Fenilalanin	Metilvörös	Voges-Proskauer
<i>Escherichia</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonella</i>	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Proteus</i>	+/-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Yersinia</i>	-	+	-	+	-	-	+	-

Jelmagyarázat:

- + a törzsek több, mint 85%-a pozitív;
- a törzsek több, mint 85%-a negatív.

Enterobacteriaceae. Háziállatok különféle beteg szerveiből tenyésztethetők ki, de megtalálhatók a bélflórában, a nyálkahártyákon és a bőrön is. A fajok elkülönítését lásd a 8.4. táblázatban.

Haemophilus. Igényességük miatt célszerűen csokoládéagarra oltjuk, V-faktor-igényüket dajkatenyésztéssel biztosítjuk. Mivel számos törzs igényel CO₂-ot, az izolálást 10–15% CO₂-ot tartalmazó légtérben ajánlatos végezni. A fajok elkülönítése a különleges tenyésztési igények miatt általában meghaladja az egyszerűbb laboratóriumok lehetőségeit.

Campylobacter. Véresagaron 48–72 óra alatt jól szaporodó hajlott pálcák, egyes baktériumflórából azonban vankomicint, polimixint és trimethoprimot tartalmazó szelektív véresagaron ajánlatos kitenyészteni. Mikroaerofilek, tenyésztésükhöz a kereskedelmi forgalomban kapható gázfejlesztő csomagok jó eredménnyel használhatók. A gázfejlesztő csomaghoz vizet adunk, s így helyezzük a beoltott táptalajokhoz. Az anaerosztát lezárása után a kívánt gázokat megfelelő arányban tartalmazó légkör alakul ki.

A BAKTÉRIUMOK ANTIBAKTERIÁLIS SZEREKKEL SZEMBENI ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

A baktériumok antibakteriális szerekkel szembeni érzékenységét a minimális bakteriosztatikus koncentráció (*MIC*) és a minimális baktericid koncentráció (*MBC*) számszerű értékével fejezzük ki. A jellemzők ismerete alapot ad a célzott antibakteriális gyógykezeléshez.

A *MIC* és az *MBC* meghatározása igen munkagényes feladat, a rutin vizsgálólaboratóriumok lehetőségeit általában meghaladja. A gyakorlati igényeket nagyon jól kielégíti a baktériumok relatív gyógyszerérzékenységének meghatározása korongdiffúziós módszerrel.

A korongdiffúziós antibiotikum-érzékenység meghatározása során a vizsgálandó baktériumot levesbe oltjuk, és 2–3 órán át tenyésztjük. A levestenyészetből gömbölyű végű üvegbottal vagy vattatamponnal szulfonamidgátló anyagoktól mentes táptalaj (pl. a kereskedelmi forgalomban is kapható Müller-Hinton-agar) felületét szőnyegszerűen beoltjuk. A táptalaj felületére ráhelyezzük a kereskedelmi forgalomban elérhető, színnel vagy felirattal megjelölt, különféle antibiotikumokkal impregnált korongokat. A Petri-csészét kb. fél órán át szobahőmérsékleten tartjuk (végbemegy a szer elődiffúziója), majd a tenyészeteket termosztátba helyezzük.

A korongokból kiáramló antibiotikum a baktériumnak az adott antibakteriális szerre való érzékenységével arányosan gátolja a baktérium szaporodását a korongok körül. A kialakult gátlógyűrűk átmérőjét 18–24 órás tenyésztés után megmérjük, és a gyártó útmutatása szerint értékeljük.

Hibaforrás. Az antibiotikum-érzékenység meghatározását szintenyészetből kell végezni. Ha a korongokat közvetlenül a klinikai minta kioltására helyezzük, a vizsgálat nem vezet eredményre (kivéve néhány, a klinikai kép alapján várhatóan szintenyészetben növekedő mintát, pl. baromfikolerás állat vérmintája, tályogminta). A szakszerűtlenül végrehajtott vizsgálat során a vegyes baktériumflórában előforduló, gyors növekedésű baktériumok elfedik a kórtanilag esetleg fontosabb törzset.

© ☹ A gyártó a korong impregnálására felhasznált antibiotikum mennyiségét a szer kémiai és fizikai tulajdonságainak ismeretében úgy határozza meg, hogy a vizsgálat értékelője közvetlen következtetéseket tehesen a szer terápiás alkalmazhatóságát illetően.

A korongdiffúziós antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok értékelésénél tekintetbe kell venni a módszer természetéből következő szemikvantitatív jellegét és azt, hogy a forgalomban lévő antibiotikum-korongok humán felhasználásra készültek, így a gyártó által megadott határértékek is az adott szer emberben tapasztalható farmakokinetikai tulajdonságaihoz

Bevezető

A vizsgálat menete

Értékelés

igazodnak. Ez az eltérés azonban az állatgyógyászati felhasználást általában nem korlátozza.

Ha a bakteriológiai vizsgálatok eredményét diagnosztikai intézet közli (megírja, hogy milyen baktériumokat izolált és azok milyen antibakteriális szerekre mutattak érzékenységet), akkor is a mintát beküldő állatorvos feladata a diagnózis felállítása és a hatékony gyógykezelési mód megválasztása. A klinikus állatorvos az, aki látta a beteg állatot, a klinikai tüneteket, az esetleges kórbonctani elváltozásokat. Neki kell kiválasztania a célnak legjobban megfelelő gyógykezelési terápiát az antibakteriális szerek farmakokinetikai tulajdonságainak, alkalmazási lehetőségeinek, árának stb. ismeretében.

Bakteriológiai vizsgálatok a lovak szaporodásbiológiai diagnosztikájában

A lovak egyedi értékének növekedésével és a mesterséges termékenyítés szélesebb körű elterjedésével egy időben jelentősen megnőtt a lovak szaporodásbiológiai gondozása iránti igény is. A vemhesülés elmaradásának hátterében sokszor a méhben zajló gyulladós folyamatok állnak, amelyek felismerését elősegítő törekvések mindeddig nem kaptak kellő figyelmet. Tapasztalataink szerint ugrásszerűen megnőtt a kancaméhből beküldött minták bakteriológiai vizsgálata iránti igény, és ezért indokolt a téma tárgyalása. A kanca endometritisére vonatkozó egyéb részleteket ➔ **KLINIKAI CITOLÓGIA**, 193. o.).

A mintavétel

Bakteriológiai vizsgálatra leggyakrabban a citológiai mintavétellel egy időben, tehát *a sárlás kezdetén* gyűjtünk mintát. Bizonyos esetekben azonban mintát kell venni a dioestrus idején is (pl. pyometra).

A bakteriológiai mintavétel során fokozottan érvényesek a citológiai mintavétellel kapcsolatos útmutatások (➔ 194. o.). Fontos, hogy adott sárlási perióduson belül korábbi beavatkozás ne érje a méh üregét. Ezért ha a citológiai és a bakteriológiai mintavételre egy időben kerül sor, először bakteriológiai célra kell mintát venni. Ma már kaphatók olyan mintavevő eszközök is, amelyekkel a két mintavétel egy időben és biztonságosan megoldható.

Fontos, hogy a mintavétel előtt a gáttájékot megfelelő módon (híg fertőtlenítőoldattal és a gát szárazra törlésével) megtisztítsuk. Ennek azért is van jelentősége, mert a mintavételt rendszerint rectalis vizsgálat előzi meg, amelynek során az egyébként tiszta gáttájék bélsárral szennyeződik.

A mintát vehetjük hüvelytükrök segítségével vagy pedig a kezünk védelmében. A hüvelytükrös módszernek az a hátránya, hogy a nyakcsatorna hiányos megnyílása esetén a tampon méhbe való juttatása nehezebb. A kéz védelmében végrehajtott mintavétellel ez a művelet könnyen megvalósítható. A mintavevő eszközt a külső méhszájig toljuk, itt a külső burkot (műanyag cső vagy fólia) átszakítjuk, és a nyakcsatornába csak a tampont védő belső burkot (műanyag cső) dugjuk be. A belső cső hegyét a belső méhszájig juttatjuk, és onnan csak a mintavevő tampont toljuk a méh üregébe. A tampont a méhben többször megforgatjuk, és kb. 30 másodperc múlva a belső csőbe visszahúzzuk. Ezt követően a belső csövet a nyakcsatornából kihúzva visszajuttatjuk a külső csőbe, amit azután a hüvelyből eltávolítunk.

Hibaforrás. A mintavétel során nagyon kell vigyázni arra, hogy a tampon csak a méh üregével érintkezzen, és ne szennyeződjön sem a gáttájékon, sem

A vizsgálatokról általában

A mintáról általában

pedig a nemi utak caudalis részén. A kanca méhének bakteriológiai vizsgálatára a házi készítésű mintavevő tamponok nem megfelelőek, mivel használatuk során nem lehetünk biztosak abban, hogy a mintát valóban a méh üregéből vettük. A hibás mintavétel következménye a téves pozitív eredmények arányának növekedése lehet. Ezért mindenképpen javasolt a kereskedelmi forgalomban kapható és többszörös védelemmel ellátott mintavevő eszközök használata (☛ KLINIKAI CITOLÓGIA, 5.30. ábra, 194. o.).

A minta tárolása, szállítása

A mintavételt követően célszerű a tampont azonnal a kereskedelmi forgalomban kapható szállító táptalajba helyezni, és a laboratóriumba juttatni. Abban az esetben, ha mikroaerofil kórokozó (pl. *Taylorella equigenitalis*) kimutatását is tervezzük, a tampont a táptalajjal együtt +4 °C-on kell tárolni.

Ha a mintákat más diagnosztikai intézetbe (laboratóriumba) küldjük vizsgálatra, akkor – esetleg a mintát feldolgozó laboratórium által rendelkezésre bocsátott – táptalajba helyezve (hűtőtáskába téve, azonnal) juttassuk el a vizsgálóhelyre.

A KANCA MÉHÉNEK BAKTERIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Bevezető

A méhben zajló gyulladásos folyamatok diagnosztizálása céljából gyakran kerül sor bakteriológiai mintavételre a kanca méhéből, esetleg hüvelyéből. Sokszor téves módon bakteriológiai vizsgálattal, ill. ultrahang-echográfiával igyekeznek meghatározni azt, hogy endometritis van-e a vemhesülés elmaradásának hátterében, vagy sem. Mint a méh citológia vizsgálatánál már említettük (☛ 193. o.), az endometritis felismerésének elsődleges módja a citológiai vizsgálat. A bakteriológiai vizsgálatnak az endometritis diagnosztikájában csak másodlagos szerepe van, de a helyes terápia meghatározása céljából nélkülözhetetlen. A bakteriológiai vizsgálat tehát nem arra a kérdésre válaszol, hogy a méhben gyulladásos folyamat zajlik-e, vagy sem, hanem arra, hogy *mi áll az endometritis hátterében*, és melyik az az antibiotikum vagy antibiotikum-kombináció, ami leghatékonyabban alkalmazható a fertőzés megszüntetésére.

A vizsgálat menete

A kancaméhből származó minták bakteriológiai vizsgálatát az általános elveknek megfelelően kell végezni (☛ 290. o.).

Értékelés

- ☉ Negatív citológiai és bakteriológiai lelet esetén a méhgyulladás egyértelműen kizárható.
- ☉ Az eredmények értékelése során körültekintően kell eljárni, és figyelembe kell venni az egyéb vizsgálatok (rectalis és ultrahang-echográfiás vizsgálat, citológia) eredményeit is.

A potenciálisan venerealis megbetegedést kiváltó mikroorganizmusokon (*T. equigenitalis*, a *K. pneumoniae* egyes típusai, a *Ps. aeruginosa*) kívül az egyéb baktériumok (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, β -hemolizáló *Streptococcus*ok, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, a *Ps. aeruginosa* „nem venerealis” törzsei, a *K. pneumoniae* 6-os, 7-es és 68-as típusa, *Corynebacterium*ok stb.) fakultatív patogéneknek minősülnek. Az általuk kiváltott gyulladáshoz vezető folyamat kialakulásában a méh védekező rendszerének hiányos működése is felelős. Ha ezeket a baktériumokat mutatjuk ki, akkor más módszerrel (citológiai vizsgálat) is alá kell támasztani a gyulladáshoz vezető folyamat meglétét.

Abban az esetben, ha a citológiai vizsgálat során a kenetben neutrophil granulocytákat találunk, és a bakteriológiai eredmény is pozitív, az endometritis diagnózisa könnyen felállítható. Ellenkezőleg: negatív citológiai és bakteriológiai lelet esetén a méhgyulladás egyértelműen kizárható.

Az eredmények értékelése akkor nehezebb, ha eltérés mutatkozik a citológiai és a bakteriológiai eredmények között. Pozitív citológiai és negatív bakteriológiai vizsgálat esetén figyelembe kell venni, hogy a hagyományos tenyésztés során elsősorban az aerob baktériumok mutathatók ki. Jogos tehát a feltételezés, hogy a gyulladáshoz vezető folyamat kialakításáért egyéb, nehezen tenyésztendő baktériumok (obligát anaerobok), gombák vagy valamilyen kémiai ártalom (pl. a méh irritáló anyag bejuttatása) a felelős.

Ha pozitív citológiai eredmény nem támasztja alá a bakteriológiai vizsgálatot, nagyon óvatosan kell eljárni az adott baktérium kórtani szerepének meghatározásában. Teljesen egészséges kancák méhéből is kitenyészthetők időnként baktériumok, pedig ezek a kancák a megfelelő időben végrehajtott fedeztetést követően mindenféle antibiotikumos kezelés nélkül vemhesülnek.

Hibaforrás. A pozitív bakteriológiai vizsgálat a helytelen mintavételnek tulajdonítható szennyeződésnek is lehet a következménye, ami téves diagnosztikai következtetés irányába terelheti a vizsgálatot végző állatorvos gondolatmenetét.

VENEREALIS PATOGÉN BAKTÉRIUMOT HORDOZÓ KANCÁK ÉS MÉNEK KIVÁLASZTÁSA

A venerealis patogén kórokozókat (*T. equigenitalis*, a *K. pneumoniae* 1-es, 2-es és 5-ös típusa, a *P. aeruginosa* egyes típusai) hordozó kancák és mének kiválasztása nagyon fontos azért, hogy természetes fedeztetés esetén ezek a kórokozók ne terjedjenek tovább.

A vizsgálatokra rendszerint a tél végén, kora tavasszal, a fedeztetési idény kezdetén, ill. esetenként a külföldre szállítást megelőzően kerül sor.

A venerealis patogén baktériumok a külső nemi szerveken, a bőr és a nyálkahártya nehezen elérhető redőiben élnek tovább, és innen kell megkísérelni kimutatásukat.

Bevezető

A mintáról

Kancák esetén a clitoris redőjéből, ill. a medialis és a ventralis sinusokból kell mintát venni. Mének esetén a mintát négy különböző helyről (preputium redői, fossa urethralis, urethra és preejaculációs váladék) gyűjtjük.

A mintavétel után a tamponokat azonnal szállító táptalajba helyezzük, és +4 °C-on tároljuk.

A vizsgálat menete A bakteriológiai vizsgálatot az általános elveknek megfelelően kell végezni (☞ 290. o.).

Értékelés ☺ ☹ A mének esetén egy hét különbséggel vett két minta negatív vizsgálati eredménye alapján lehet kimondani a venereális patogénektől való mentességet. Ha a mintából kórokozó baktériumot tenyésztünk ki, akkor megfelelő antibakteriális kezelést kell végezni, majd ennek eredményét az előbbi módon, kétszeri bakteriológiai vizsgálattal ellenőrizzük.

Virologiai diagnosztika

A különböző kórformákat előidéző, patogén vírusok elleni védekezés az állatorvosi munka egyik leglényegesebb eleme, a hatékony védekezés alapvető feltétele pedig a specifikus és lehetőleg minél gyorsabb diagnózis. Hazai viszonyok között a gyakorló állatorvosoknak vírusdiagnosztikai munkára alig van lehetőségük. Egy-egy kórkép vírusos jellegére utalhat a jellegzetes klinikai kép (pl. a macska coronavírussal peritonitise) vagy a szöveti elváltozások (pl. a kutya szájpapillomatosis), de a legtöbb kórkép (pl. a kutyák enteritise) előidézésében több vírus, baktérium vagy akár nem fertőző faktor is szerepet tölthet be. Közülük a valódi kórokozót csak specifikus vizsgálattal lehet kiválasztani.

A gyakorló állatorvos munkájában a specifikus vírusdiagnosztika csak elvétve kap helyet, mert az ilyen, többnyire steril körülményeket igénylő munkához (szövettenyésztéshez, diagnosztikai minták feldolgozásához stb.) a szükséges feltételek többnyire csak szaklaboratóriumokban teremthetők meg.

A vizsgálatokról általában

A VIROLÓGIAI LABORATÓRIUM ÉS FELSZERELÉSE

A virológiai vizsgálatok különböző szinten végezhetők. A modern diagnosztikumokat előállító cégek egyre nagyobb számban dolgoznak ki különböző vírusfertőzések kimutatására olyan diagnosztikai készleteket, amelyekkel a vizsgálatok a mintavétel helyszínén vagy rendelőben, klinikán is elvégezhetők. Az antigén- vagy ellenanyag-kimutatásra alkalmas reagenskészletek (ún. kitek) működése általában enzimreakciókon alapul, a minta pozitívítása (antigén- vagy ellenanyag-tartalma) színreakciók alapján, speciális műszerek és szakirányú végzettség nélkül is megállapítható. Ilyen többek között a macskaleukosis vírus elleni ellenanyagok kimutatására alkalmas vagy a FIV (*feline immunodeficiency virus*) ellen képződött ellenanyagokat kimutató tesztkészlet (☛ 322. és 325. o.).

A legveszélyesebb, nagy terjedőképességű, nagy morbiditással vagy mortalitással járó vírusokkal a vizsgálatok csak szigorú biztonsági feltételek mellett működő, a kikerülő hulladék megsemmisítését, a kiáramló levegő és az ott dolgozó, általában speciálisan képzett személyzet dekontaminálását biztosító zárt laboratóriumokban végezhetők. Ezek létrehozása, fenntartása és működtetése igen nagy összegeket igényel, ezért kormányzati feladat.

A vizsgálatok túlnyomó többsége azonban olyan „középszintű” (nem hivatalos megjelölés!) laboratóriumokban zajlik, amelyekben a virológiai, vírusszerológiai munkára szakosodott személyzet dolgozik, s ahol a ko-

rábban említett steril munkavégzéshez szükséges feltételek megteremthetők. A sterilizálást szolgáló eszközök (hőlégmentalizátor, autokláv, baktériummentesítő szűrők stb.) mellett ezekben a laboratóriumokban a csíra mentes környezetet por- és huzatmentes steril fülkében vagy szűrt levegős, túlnyomásos, ún. lamináris boxokban biztosítják. A vírusok elszaporításához, izolálásához, a szerológiai vizsgálatok egy részéhez szükséges szövettenyészetek csak ilyen körülmények között állíthatók elő. Az ilyen laboratóriumok működtetéséhez szükséges legfontosabb műszereket, eszközöket és anyagokat ismertetjük a következőkben.

Műszerek/készülékek: autokláv, hőlégmentalizátor, mélyhűtő, hűtő, mágneses keverő, baktériummentesítő folyadékszűrők, mikroszkóp, termosztátok, ioncserélő vagy desztillálókészülék, analitikai mérleg, hűthető centrifuga.

Eszközök: edény folyékony nitrogén tárolására, pipetták, üvegedények, szövettenyésztő palackok, kézi műszerek, Bunsen-égő, homogenizátorok.

Anyagok: a sejtek *in vitro* szaporodását és túlélését biztosító táp- és fenntartó folyadékok, foetalis vagy újszülött borjúsavó, tripszin, pufferek készítéséhez sók, antibiotikumok, antimikotikumok, referens vírustörzsek és immunsavók, sejtvonalak.

A mintavétel

A mintáról általában

Virologiai vizsgálatra az élő állatból származó különféle klinikai minták, váladékok alkalmasak (pl. orrváladék, vér, ritkábban tej, bélsár, liquor vagy nyál); elhullott állatból szerveket, szervdarabokat vizsgálhatunk.

A mintavételnél nagyon fontos, hogy a mintát mikor és honnan vesszük, és az mennyi idő alatt érkezik a vizsgálatot végző laboratóriumba.

Mintavétel direkt víruskimutatáshoz. A mintát az elváltozást mutató szervrendszerből vegyük: pl. légzőszervi megbetegedés esetén élő állatból a mintát orrtamponnal gyűjtjük, elhullott állatból pedig a tüdőt, a légcsővet vagy annak darabjait különítsük el. Fontos, hogy a direkt víruskimutatásra szánt diagnosztikai mintákat minél korábban, rövid idővel a klinikai tünetek jelentkezése után (vagyis a vírusok tömeges ürülésekor) vegyük. Gondosan ügyelni kell arra, hogy a vírusok megőrizték fertőzőképességüket a laboratóriumba érkezésig, ugyanakkor meg kell akadályozni, hogy a másodlagos (baktériumos) társfertőzések megnehezítsék az elsődleges kórokozó felderítését.

Mintavétel indirekt víruskimutatáshoz. A direkt víruskimutatás (főleg a heveny fertőzések esetében) csak egy rövid, legfeljebb néhány napos vírusürítési, ill. vírushordozási periódusban lehetséges. Ezért sokszor az indirekt víruskimutatás módszereit kell felhasználnunk a vírusok okozta betegségek kórjelzésére vagy egy állományban rendszeresen előforduló vírusok meghatározására (vagyis az állomány járványtani állapotának felmérésére). Ilyenkor a különböző szerológiai módszerekkel a vérsavóban kimutatott ellenanyagok jelenléte utal egy állat vagy az állomány fertőzöttségére.

Mivel az immunglobulinok a vérben (tejben, liquorban stb.) a fertőzést követően több hónapig perzisztálnak, ebben az esetben a vizsgálat idő-

pontja nem olyan szűken behatárolt. Lényeges, hogy figyelembe vegyük az állományban végzett esetleges immunizálásokat, valamint fiatal állatokban a maternális ellenanyagok jelenlétének lehetőségét. A jelenleg alkalmazott vakcinákkal és szerológiai módszerekkel ugyanis a maternális ellenanyagok, valamint a vakcinázás és a fertőződés következtében kialakuló immunglobulinok között többnyire nem lehet különbséget tenni.

Az indirekt víruskimutatáshoz többnyire vérmintát veszünk, ritkábban tej-, liquor- vagy nyálmintát gyűjtünk. A vérmintát alvadásgátlót és konzerválószerrel nem tartalmazó steril csövekbe vesszük.

A minta tárolása, szállítása

A minták általában baktériumokkal, takarmányszemcsékkel, szövettörmelékkel, porral stb. szennyezettek.

A steril vattatamponnal levett mintához antibiotikum-tartalmú pufferoldatot vagy 100 NE/ml penicillint, 100 mg/ml sztreptomocint vagy egyéb, vízben oldódó antibiotikumot tartalmazó élettani NaCl-oldatot adunk az izotónia és az izoionia biztosítása, ill. a baktériumszaporodás visszaszorítása érdekében.

A szervdarabokat hűtőtáskában, de lehetőleg nem fagyasztva szállítjuk, mert az érzékenyebb (burkos) vírusok a fagyasztás, ill. az azt követő felolvasztás hatására elveszíthetik a fertőzőképességüket.

Frissnek (vagyis virológiai vizsgálatra legalkalmasabbnak) az a minta tekinthető, amelyik a mintavételtől számított *egy napon belül* a szaklaboratóriumba érkezik.

Mindig különös figyelmet kell fordítani a kórelőzményi adatok (a legfontosabb járványtani és klinikai megfigyelések, a korábbi kezelések stb.) közlésére, amely információk irányíthatják és nagymértékben megkönnyíthetik a laboratóriumi szakemberek munkáját.

DIREKT ÉS INDIREKT VÍRUSKIMUTATÁS

A vírusfertőzések felismerésére direkt és indirekt módszereket alkalmazunk:

- a *direkt* eljárások során magát a vírust vagy annak valamely alkotórészét (fehérje- vagy nukleinsav-komponenseit),
- az *indirekt* (vírusszerológiai) eljárásokkal pedig az ezek hatására a fertőzött állatokban termelődött ellenanyagokat mutatjuk ki.

Direkt víruskimutatás

Vírusizolálás. A vírus direkt kimutatásának alapvető módszere a vírusizolálás, vagyis az a folyamat, amelynek során a diagnosztikai mintából a vírust valamelyik vírusszaporítási módszerrel elszaporítjuk, és azonosítjuk. A sikeres vírusizolálás feltétele tehát, hogy a mintában fertőzőképes virionok legyenek.

Bevezető

A vizsgálatok menete

A vírusizolálás esélyei a mintavételtől számított idő függvényében csökkennek, ezért a feldolgozást minél előbb meg kell kezdeni.

Vírusszaporítás. A vírusszaporítás csak élő sejtekben valósítható meg, pl. embrionált tyúktojásban vagy túlélő szövettenyészetekben. A művelet több hétig is eltarthat; az időigény függ a vírus szaporodási ciklusától, továbbá az esetleg szükséges átoltások számától.

A vírus azonosítása. A vírusizolálás műveletéhez hozzátartozik a vírus azonosítása, vagyis vírusrendszertani helyének pontos megállapítása. Legelőször azt kell megállapítani, hogy a vírus melyik családba tartozik. Ebben segítséget nyújthat a szövettenyészetek mikroszkópos vizsgálata során *tapasztalt sejtkárosító hatás*, *a vírus sejt spektruma* stb., de ezek önmagukban semmiképpen nem elegendők. A pontos besorolást a vírus fizikai-kémiai (DNS vagy RNS-e a genom, egyszálú vagy kétszálú-e a nukleinsav) és morfológiai tulajdonságainak (méret, szimmetria, burok jelenléte vagy hiánya) vizsgálata teszi lehetővé.

- Kloroformkezeléssel állapítjuk meg, hogy *burkos vagy burok nélküli vírust* izoláltunk: a burkos vírusok e kezelés hatására elveszítik fertőzőképességüket, mivel lipidtartalmú burkukat (és ezzel a sejthez való kötődésben szerepet betöltő külső fehérjéket) a kloroform leoldja.
- A vírusszaporítás során a sejttenyészethez halogénezett uridinszármazékokat adva eldönthető, hogy *a vírus genomja DNS vagy RNS*. A halogénezett uridinszármazékok a DNS replikációja során a timidin helyére épülnek, gátolják a nukleinsav-szintézist, ezért a vírus nem szaporodik. A timidint nem tartalmazó RNS-vírusok replikációját e vegyületek nem gátolják.
- A vírussal fertőzött szövettenyészeten akridinoranzs-festés után *az egyszálú vírusnukleinsav piros, a kétszálú sárga fényben fluoreszkál*.

Az előbbi vizsgálatokat elvégezve megállapítható, hogy az izolátum melyik vírusszaládba tartozik. Az összehasonlítást a vírusok legfontosabb tulajdonságait összegző táblázatok segítik.

A továbbiakban szerológiai módszerekkel a vírus szerotípusát kell meghatározni. Erre szerológiai eljárásokat kell alkalmazni: legtöbbször a vírusneutralizációs vagy a hemagglutináció-gátlási próbát, ritkábban agargélprecipitációt, komplementkötési próbát stb.

Egyéb módszerek. A direkt víruskimutatás egyéb módszerei nem követelik meg a virionok fertőzőképességét, vagyis nem igénylik a vírus elszaporítását. Ezek a vizsgálati módszerek általában néhány nap, bizonyos esetekben néhány óra alatt eredményt adnak. Ilyen módszerek a következők:

- elektronmikroszkópos kimutatás,
- immunfluoreszcencia (IF),
- agargél-precipitáció (AGP),
- ellenáramú immunelektroforézis,
- ELISA,
- PCR-vizsgálatok (az ún. polimeráz láncreakción alapuló eljárás).

Egyes, ma még meglehetősen ritkán és a betegségek szűk körében alkalmazott vizsgálati módszerekkel (pl. PCR) bomló, autolizált mintából is kimutatható a vírus.

Indirekt víruskimutatás

A vírusszerológiai eljárások lényege, hogy a vírus hatására termelődött ellenanyagokat mutatjuk ki a fertőzött állatokban. A vizsgálat időigénye a választott módszertől függően néhány nap (pl. vírusneutralizáció, AGP) és néhány óra (pl. indirekt ELISA, hemagglutináció-gátlás, komplementkötési próba) közötti lehet.

A vírusellenes ellenanyagok kimutatásának két célja lehet. Az egyik, amikor a vizsgálat a járványtani állapot felmérése irányul, vagyis azt kell megállapítani, hogy milyen vírusok fordulnak elő rendszeresen egy adott állományban. Ilyenkor a statisztikai mintavétel szabályai szerint (általában kb. az állatok 10%-ából) vett vérmintákat kell vizsgálatra küldeni. A több vírussal elvégzett szerológiai vizsgálatok során a pozitív eredmények mutatják az állomány vírusfertőzöttségét.

Más esetekben a vizsgálat célja az adott időpontban megbetegedéseket előidéző járvány kórokozójának felderítése. Ilyenkor a direkt víruskimutatás mellett (ha erre nincs lehetőség, akkor helyette) *savópárok*at kell vizsgálni. Ez azt jelenti, hogy frissen megbetegedett állatokból veszünk vért, majd 2–3 hét múlva (áthangolódásuk után) ugyanazokból az állatokból ismét küldünk vérmintát. Ha a később vett mintákban egy adott vírus ellen ellenanyagok jelennek meg, vagy a korábbinál lényegesen nagyobb titerben vannak jelen, az arra utal, hogy az állományban ez a vírus okozza a megbetegedést.

☹ ☹ A vírusok jelentős része nem okoz betegséget, ezek az ún. apatogén vagy „orphan” (árva) vírusok. A fogékony szervezetbe kerülve a vírus elszaporodik, de nem okoz olyan elváltozásokat, amelyek a szervezet megbetegedését vonnák maguk után. A vírusok egy másik része patogén ugyan, de nem virulens, vagyis a betegséget okozó gén aktivitása jelentősen korlátozott. Az ilyen avirulens vírustörzsek felhasználhatók vakcinakészítésre, ill. ún. attenuálással mesterségesen is létrehozhatók vakcina előállítás céljából. Az orphan vagy avirulens vírusok szaporodása a szervezetben aktiválja az immunrendszert, interferon- és ellenanyag-termelést vált ki. Az ilyen vírusok kimutatása a szervezetből lehetséges, de hamis diagnózishoz vezethet, ezért a víruskimutatási eredményeket más eredményekkel (klinikai megfigyelések, kórbonctani, szövettani eredmények stb.) együtt kell értékelni.

Értékelés

A korábbiak alapján nyilvánvaló, hogy a vírusok direkt kimutatása (az egyelőre kevés betegség diagnosztizálására hozzáférhető gyorsesztek kivételével) meglehetősen időigényes feladat. A vírusizolálás általában több hetet igényel. Az elektronmikroszkópos víruskimutatás vagy a vírus-

antigének kimutatása (pl. komplementkötési próbával, ELISA-módszerrel vagy immunfluoreszcens vizsgálattal) néhány óra alatt elvégezhető. E vizsgálatok eredménye felhasználható a terápia során: vírusellenes szerek, immunsavók alkalmazását indokolhatja.

Az indirekt víruskimutatás (ellenanyagok kimutatása) csak a fertőzést követő 7–10. naptól kezdődően lehetséges, amikor már kimutatható mennyiségben vannak a vérben a fertőzést okozó vírus ellen termelődött ellenanyagok. Az eredmények tehát állományvizsgálat esetén az állomány (kennel, szarvasmarhatelep, ménes stb.) vakcinázási stratégiájának kidolgozásában segítenek, egyedi vizsgálat (savópár vizsgálata) esetén pedig a korábbi diagnózist erősítik vagy cáfolják meg, így pl. szavatossági esetekben használhatók. Előfordul, hogy az indirekt víruskimutatás eredménye alapján a szeropozitív egyedek szelekciója vagy elkülönítése, tenyésztésből való kivonása javasolt (pl. macskák FIV-fertőzöttsége, szarvasmarha-leukosis, ló fertőző arteritise), vagy exterminálásuk hatóságilag kötelező (pl. lovak fertőző kevésvérűsége), mert a szeropozitív állatok egyben vírus-hordozók is, így az adott fertőzés fenntartói és terjesztői.

Immundiagnosztika

Az *in vitro* immundiagnosztikai vizsgálatok elősegítik a fertőző betegségek megállapítását, a kórokozók azonosítását, besorolását, ill. alkalmasak az autoimmun betegségek megállapítására, valamint az immunrendszer válaszképességének értékelésére. Az immundiagnosztikai próbákat többnyire nem a klinikus állatorvos hajtja végre, hanem az arra felkészült szakközpontok, bár az egyszerűbb vizsgálatok (pl. a tárgylemez-agglutinációs próba) rendelési körülmények között is elvégezhető. Egyes klinikák, rendelők részéről egyre nagyobb az érdeklődés az immundiagnosztikai eljárások – különösen a gyári reagenskészletekkel kivitelezhető próbák – iránt.

A következőkben áttekintjük a diagnosztikai intézetekben végzett immundiagnosztikai eljárásokat, különös tekintettel a szakközpontok által megküldött eredmények értékelésére. Részletesebben foglalkozunk azokkal az eljárásokkal, amelyeket a klinikus is el tud végezni. A gazdasági haszonállatok szerológiai vizsgálata – gyorsvizsgálatokra alkalmas tesztek hiányában – általában a felkészült diagnosztikai laboratóriumokban zajlik, így ezek részletes ismertetésétől eltekintünk. A kisállatpraxis igényeihez kifejlesztett, a jól felszerelt gyakorló állatorvos által is elvégezhető immunológiai vizsgálatokat ➔ IMMUNOLÓGIAI RUTINVIZSGÁLATOK A KISÁLLATGYÓGYÁSZATBAN, 321. o.).

A mintavétel

A szerológiai próbákhoz vér-, tej-, esetleg egyéb váladékmintát (liquor stb.) veszünk. A próbákat leggyakrabban vérsavóból, a celluláris próbákat és egyes vírusantigének kimutatására szolgáló próbákat fehérvérsejtekből hajtjuk végre.

A mintavétel általános tudnivalóit ➔ 21. o. (vér), 246. o. (tej), 406. o. (liquor).

A vérsavó elkülönítése. Az alvadásában nem gátolt vérmintát 37 °C-on egy óráig, majd +4 °C-on egy napig állni hagyjuk. Az alvadék körülvágása és centrifugálása után a savó kinyerhető. A szérumkiválást gyorsító vércsővek (➔ 31. o.) alkalmazása itt is ajánlott.

A fehérvérsejtek elkülönítése. Az alvadásban gátolt vért (heparin, EDTA) szeparálóoldatra (pl. Ficoll-paque) rétegezzük, amely az ezt követő centrifugálás során a vörös- és fehérvérsejteket elkülöníti. Az így kinyert fehérvérsejteket 2–3-szori mosás után tápfolyadékban (RPMI-1640, Hank's MEM) szuszpendáljuk.

A vizsgálatokról általában

A mintáról általában

A minta tárolása, szállítása

Az elkülönített vérsavót hűtőszekrényben +4 °C-on vagy mélyhűtve -18 °C-on, a tápfolyadékban lévő fehérvérsejteket +4 °C-on tárolhatjuk 12–24 óráig.

Ha a mintákat más diagnosztikai intézetbe küldjük vizsgálatra, akkor hűtőtáskába téve, azonnal juttassuk el a vizsgálóhelyre. Mindig különös figyelmet kell fordítani a körelőzményi adatok (klinikai megfigyelések, korábbi kezelések stb.) közlésére, mert ezek a laboratóriumi szakemberek számára hasznos segítséget nyújtanak.

SZEROLÓGIAI PRÓBÁK

Bevezető

A szerológiai próbák során az ellenanyagok vizsgálatával indirekt módon megállapítható, hogy a szervezet találkozott-e már a kórokozóval. A fertőzés lezajlása után ugyanis a fertőző ágens gyakran már nem mutatható ki, ugyanakkor a vele szemben képződött specifikus ellenanyag még hosszú ideig perzisztál és kimutatható. A szerológiai próbák nemcsak az ellenanyagok kimutatását, hanem antigének (vírus, baktérium stb.) azonosítását is lehetővé teszik.

A szerológiai próbák során először az antigén és az ellenanyag között kémiai kapcsolódás jön létre, majd ennek következtében kolloidkémiai folyamatok játszódnak le, s ennek során alakul ki a látható végtermék.

- Az *agglutinációs próbák* során a korpuszkuláris antigén az ellenanyaggal való kapcsolódás után összezsapódik, és kiválik a rendszerből.
- A *precipitációs próbában* az oldott állapotú antigén kicsapódik az oldatból
- A *komplementkötési próbában* a kialakult antigén–ellenanyag-komplex megköti a komplement rendszert, megakadályozva ezzel a vörösvérsejtek hemolízisét.

A vizsgálatok menete

Agglutinációs próbák

Tárgylemez-agglutinációs próba. Gyorsan kivitelezhető eljárás, de csak kvalitatív vizsgálatra alkalmas. A tárgylemezre a vérmintához (pl. baromfityphus, mycoplasmosis) antigénoldatot cseppentünk. Pozitív esetben percekben belül észleljük az összezsapódást. A próba használható baktériumtörzsek azonosítására is.

Csőagglutinációs próbák. A vizsgálandó vérsavóból felező hígítási sort készítünk, és az egyes hígításokat antigénoldattal elegyítjük. A reakció kialakulása több órát vesz igénybe. A próbával meghatározható az ellenanyag titere (a legnagyobb hígítási fok, ahol még pozitív a reakció), vagyis a módszer kvantitatív vizsgálatra alkalmas. A diagnosztikai intézetek az agglutinációs próbákat brucellosis, listeriosis, yersiniosis, tularaemia, ill. módosított formáját leptospirosis-fertőzöttség kimutatására használják. Brucellosis esetén a tejjel ürülő ellenanyagokat festett brucellák hozzáadásával mutatjuk ki (ABR-próba).

Passzív vagy indirekt agglutinációs próba. Az antigént valamilyen nagyobb méretű részecske (vörösvérsejt, latex, bentonit) felületére kötjük. Ily módon oldott állapotú vagy igen kis méretű antigén is kimutatható agglutinációs próbával. Az eljárást általában baktériumok azonosítására használjuk.

Antiglobulin- vagy Coombs-próba. A vizsgálandó vérsavó és az antigén elegyéhez antiglobulint adunk, ami összekapcsolja a baktériumhoz kötődött inkomplett ellenanyagokat, és így létrejön az agglutináció. A módszerrel az inkomplett, monovalens ellenanyagok mutathatók ki, pl. brucellosis-fertőzöttség esetén.

Hemagglutináció-gátlási próbába (HAG). A vizsgálandó savóból készített hígítási sorhoz adjuk a kórokozót, majd a megfelelő inkubációs idő után vörösvérsejt-szuszpenzával elegyítjük. A savóban lévő ellenanyag blokkolja a kórokozó hemagglutináló fehérjéit, így a vörösvérsejtek összecsapódása elmarad, azok leülepednek. A próbával meghatározható az ellenanyag títtere, pl. baromfipestis-, mycoplasmosis-, influenzafertőzöttség esetén.

Precipitációs próbák

Csőprecipitációs próbák. Az antigénoldathoz adott ellenanyag-tartalmú savó hatására pelyhes csapadékkiválás figyelhető meg pozitív esetben. Az intézeti diagnosztikai munka során a próba a lépfene-baktérium antigénjének kimutatására (Ascoli-féle termoprecipitációs próba), valamint a húsvok faji származásának meghatározására használható (Uhlenhut-féle próba).

Agargél-precipitációs próbák. Petri-csészébe öntött agarba kis lyukakat készítenk, és ezekbe mérjük be a vizsgálandó vérsavót, ill. az antigénoldatot. Ezek diffúzióval jutnak az agarba, s ottani találkozásuknál – pozitív esetben általában 24 óra alatt – kialakul a precipitációs ív. A precipitációs próbák gyorsasága és érzékenysége nagymértékben növelhető az elektroforézissel való kombinálásukkal. A kétdimenziós kettős géldiffúziós módszer (Ouchterlony-teszt) alkalmas a fertőző kevésvérűség, a leukosis és a bluetongue vírusával szemben képződött ellenanyagok kimutatására.

Komplementkötési próba (KK)

A vizsgálandó vérsavót inkubáljuk az antigénoldattal és a komplementtel (tengerimalac vérsavó). Ehhez hozzáadjuk a juh vörösvérsejtet és a vele szemben termelt ellenanyagot (hemolizin) tartalmazó jelzőrendszert. Pozitív esetben a kialakult antigén-ellenanyag-komplex megköti a komplementet, és elmarad a hemolízis. A próbának ismert az indirekt formája is, amely inkomplett, monovalens ellenanyagok kimutatására használható. A komplementkötési próbát a diagnosztikai intézetek a brucellosis, a chlamydiosis, a toxoplasmosis, a takonykór, valamint a tenyészbénaság, a paratuberculosis és a Q-láz diagnosztikájában alkalmazzák.

Jelzéses módszerek

Az ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) módszer elve az, hogy a kialakuló, a lemez felületéhez kötött antigén-ellenanyag-komplex mennyisége, így az ellenanyaghoz konjugált enzim aktivitása is arányos a minta antigéntartalmával. Az enzimaktivitás következtében kialakuló színreakció fotometriásan mérhető. Az ELISA-próba alkalmas mind az ellenanyag, mind az antigénoldat koncentrációjának meghatározására. *Brucella abortus*, *B. suis*, Aujeszky-betegség, a ló fertőző kevésvérűsége, a sertéspestis, a szarvasmarha-leukosis, az IBR-, FIP-, FIV-, FeLV-fertőzöttség és még számos más betegség esetén alkalmazzák. Az utóbbi három, kisállatok esetében használt módszert ➔ IMMUNOLÓGIAI RUTINVIZSGÁLATOK A KISÁLLATGYÓGYÁSZATBAN, 321. o.

Értékelés

☺ ☹ A vizsgálat negatív eredménye fertőzésmentességre utal, de számításba kell venni a hamis negatív eredmények lehetőségeit is (pl. a fertőződés és a mintavétel közötti túl rövid idő, anergiás állat, mintavételi, technikai hiba).

A pozitív eredmény azt jelzi, hogy az állat már találkozott kórokozóval. A hamis pozitív reakció leggyakoribb oka a kórokozók közti keresztreakció, amit megismételt (savópár-) vizsgálattal vagy a szoba jöhető ágensekkel párhuzamosan elvégzett próbával lehet kiszűrni. A nagy ellenanyagtiterek friss fertőzésre utalnak, a kisebb titerértékeket magyarázhatja korábbi vakcinázás, a fertőződéstől eltelt rövid idő, de kis titerértéket mérünk régi áthangolódás esetén is. Ennek pontos okára a körelőzményi adatok és savópárvizsgálat deríthet fényt. A szerológiai titerek relatív értékek, amelyeket több tényező befolyásol:

- a kórokozó faja,
- az antigén jellege,
- a betegség kórfejlődése,
- az alkalmazott módszer és
- a gyógykezelés.

Az egyes szerológiai próbák eredményeinek összehasonlításából a fertőzés lefolyására is következtethetünk, mivel a különböző típusú ellenanyagok a próbák során eltérő reakciókészséget mutatnak. Az agglutinációs próbában elsősorban az IgM és az IgG, a precipitációs próbák során főleg az IgG, kevésbé az IgM, a komplementkötési próbában az IgG vesz részt a komplexképzésben. Friss fertőzéskor főként az agglutinációs és a precipitációs, előrehaladottabb esetben pedig a komplementkötési próba ad pozitív eredményt. Legtovább az inkomplett ellenanyagok perzisztálnak, ezért ilyen esetben a Coombs-próba és az indirekt komplementkötési próba pozitív. Az egyes szerológiai vizsgálatokat a vizsgálati körülményeket figyelembe véve, kontrollsavókat alkalmazva a vizsgáló intézet értékeli.

CELLULÁRIS PRÓBÁK

A celluláris próbákkal az immunrendszer sejtjeinek válaszkészségét vizsgálhatjuk. A lymphocystestimulációs próba, a macrophagmigráció-gátlási próba és az immunrozetta-képzési teszt a szekunder immunválaszban szerepet betöltő, hosszú életű memóriasejtek válaszképességét, míg a citotoxikus reakció tesztje az effektor (killer) sejtek aktivitását méri. Az említett eljárások szaklaboratóriumi felkészültséget igényelnek, az immunrozetta-képzési teszt azonban rendelési körülmények között is elvégezhető.

Bevezető

Immunrozetta-képzési teszt

A vizsgálandó fehérvérsejt-szuszpenzióhoz olyan juh vörösvérsejteket adunk, amelyek felületére előzetesen a kérdéses antigént adszorbeáltattuk. Pozitív esetben néhány órán belül a vörösvérsejtek a fehérvérsejtek felületéhez kötődnek. A reakció a kenet mikroszkópos vizsgálatával bírálható el.

A vizsgálatok menete

☺ ⊗ Negatívnak tekinthetjük a vizsgálatot akkor, ha a lymphocyták kevesebb, mint 5%-a volt rozettaképző. Pozitív a próba, tehát az állat szenzibilis az adott antigénre akkor, ha a rozettaképző sejtek aránya 5-30% közötti.

Értékelés

AUTOIMMUN BETEGSÉGEK DIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁSAI

Az autoimmun betegségek diagnosztikája iránt az utóbbi időben növekvő érdeklődés tapasztalható. A vizsgálatok egy része, így az autoimmun haemolyticus anaemia (AIHA) vagy a rheumatoid faktor kimutatása egy jól felszerelt rendelőben is elvégezhető, más részük azonban (antinucleus ellenanyagok kimutatása, autoimmun bőrbetegségek diagnosztikája) speciális laboratóriumot igényel.

AUTOIMMUN HAEMOLYTICUS ANAEMIA

Az autoimmun haemolyticus anaemia diagnosztizálására a Coombs-próba használatos. A Coombs-reagensből (anti-IgG, IgM, C3) felező hígítási sort készítünk, és ehhez adjuk a mosott és hígított vörösvérsejt-szuszpenziót. A reagensben lévő antiglobulinok pozitív esetben kapcsolódnak a vörösvérsejtek felületéhez kötődött ellenanyagokkal, ezáltal azok rácsszerű alakzatot képezve agglutinálódnak a cső alján.

RHEUMATOID FAKTOR

Az IgG-molekula Fc-részevel szemben termelődött ellenanyagokat (IgM) mutatjuk ki passzív agglutinációs próbával.

ANTINUCLEUS ELLENANYAGOK

A szisztémás lupus erythematosus diagnosztikájában a sejtmag anyagával (DNS, nukleoproteinek) szemben termelődött autoellenanyagok kimutatására használjuk (ANA-teszt). A vérsavóból készített hígításokat tárgylemezre fixált sejtenyészetre mérjük, majd megfelelő inkubálás után a megkötődött ellenanyagokat antiglobulin-FITC-konjugátummal jelöljük, és fluoreszcens mikroszkóppal bíráljuk el.

Immunológiai rutinvizsgálatok a kisállatgyógyászatban

A kisállatgyógyászatban a betegségek felismerésének elősegítésére és mentesítési célokból széles körben alkalmaznak immunológiai vizsgálatokat. Számos gyorsteszt van forgalomban, amelyek lehetővé teszik, hogy a diagnosztikai laboratóriumok mellett a jól felszerelt rendelőben több immunológiai vizsgálat elvégezhető legyen. A gyorstesztnek nagy része a klasszikus ELISA-módszer (☛ 318. o.) módosított változata. Ilyenek az ún. microwell-technikán és a migrációs elven alapuló tesztek. Előnyük, hogy használatukhoz laboratóriumi alapfelszerelés (pipetták, spektrofotométer stb.) is elegendő, míg a klasszikus ELISA-módszer kivitelezése szaklaboratóriumot igényel.

A vizsgálatokról általában

A mintával kapcsolatos tudnivalókat ☛ 315. o.

A mintáról általában

CHLAMYDIOSIS

A *Chlamydia psittaci* főként macskákban okoz – elsősorban szem-, ill. szem környéki – gyulladást okozó folyamatokat (conjunctivitis, keratoconjunctivitis), ritkábban légzőszervi és emésztőszervi tünetekkel járó kórformákat, kutyákban conjunctivitis, pneumonia és enteritis formájában jelentkezik.

Bevezető

A kórokozó kitenyésztése és a heveny esetekben festéssel (Stamp- vagy Giemsa-féle festés) való kimutatása mellett a fertőzöttséget igazolhatjuk, ha a kórokozó antigénjeit a különböző testfolyadékokból hagyományos vagy migrációs ELISA-módszerrel kimutatjuk, vagy indirekt immunfluoreszcens (IF-) módszerrel a képződött ellenanyagokat vizsgáljuk.

Antigénkimutatás (ELISA-módszer)

Az emberi *C. trachomatis* kimutatására készült, a chlamydiák nemzetség-specifikus antigénjeit kimutató ELISA-módszer jól használható a kisállatgyógyászatban, érzékenysége mintegy 70%-os.

A vizsgálatok menete

Antigénkimutatás (migrációs tesztek)

A migrációs tesztek a *C. psittaci* lipopoliszacharidjának kimutatására alkalmasak. A különleges nedvszívó anyagra juttatott ellenanyagok az oldatba vitt antigénnel antigén-ellenanyag-komplexeket képeznek. Pozitív reakció

esetén a komplex kapillárishatásra a színeképző zónába vándorol (migrál), amit színes sáv kialakulása jelez.

Ellenanyag-kimutatás (indirekt IF-módszer)

Az indirekt IF-vizsgálat során *C. psittacival* fertőzött sejtenyészetek felhasználásával a vérsavóból kimutathatók a kórokozó elleni ellenanyagok.

Értékelés

☉ ☉ A 4–6 hetes időközzel végzett, kétszer negatív eredményű vizsgálatok fertőződésmertességre, a pozitív eredmények *chlamydiosisra* utalnak.

MACSKALEUKOSIS

Bevezető

A macskaleukosis (okozója az FeLV, *feline leukaemia virus*) klinikai megállapítása nehézségbe ütközhet, mert a betegség megjelenése nagyon változatos (generalizált vagy lokális lymphoma, myeloproliferatív elváltozások, lymphoid leukaemia, nemregeneratív anaemia, uveitis, neurológiai elváltozások stb.). Gyakran a vírusfertőzöttség miatt létrejövő ellenállóképesség-csökkenés következtében alakulnak ki másodlagos fertőzések, amik elfedhetik az alapbetegséget (pl. krónikus bakteriális légzőszervi vagy alsó húgyúti gyulladások). A daganatos kórformák ritkák, a fertőzött egyedek kevesebb, mint 5%-ában alakulnak ki.

A nehezen kivitelezhető vírusizolálás helyett a diagnosztika az alábbi szerológiai próbákra támaszkodik:

- az FeLV vagy a FOCMA ellen képződött ellenanyagok kimutatása,
- indirekt immunfluoreszcens (IF) vizsgálat (hematológiai kenetek felhasználásával),
- vírusantigén kimutatása (ELISA-módszer),
- vírusantigén kimutatása migrációs tesztekkel (módosított ELISA-módszer).

Az FeLV eredetű *vírusantigéneket* – leggyakrabban a gp27-es glükoproteint, az ún. core- (mag-) antigént, vagy a daganatosan transzformálódott sejtek felületén megjelenő, sejt eredetű antigént (FOCMA, *feline oncovirus membrane antigen*) általában ELISA-elven alapuló módszerekkel mutatjuk ki.

Kétféle ELISA-teszt típus van forgalomban: a polisztirollemezen végezhető tesztek több minta vizsgálatára, az ún. *microwell-technikán* alapuló tesztek sorozatvizsgálatokra, a *migrációs tesztek* pedig egyedi vizsgálatokra alkalmasak (monotesztek). Mindkét típus esetén vírusantigént mutatunk ki, és nem ellenanyagot.

Az FeLV diagnosztikájában a klinikai rutinyakorlatra – főként a fertőzöttség tüneteit mutató állatokban – elsősorban az ELISA-tesztek ajánlhatók. A tenyésztállatok mentesítésekor a 4–6 hetes időközzel ismételt kétszeri ELISA-teszt vagy IF-vizsgálat, esetleg vírusizolálás szükséges. Jelenleg sem az IF, sem a vírusizolálás nem érhető el Magyarországon a rutinyakorlat számára.

A latens FeLV-infekció kevés (nem kimutatható) vírusantigén termelődését, vagy a vírusnak a gazdasejt genomjába integrálódását (látenciába vonulását) jelenti. Ez néha bizonytalanná teszi az értékelést. Ilyenkor ugyanis vírusfehérje nem vagy csak alig termelődik, a kis mennyiségű, vírus eredetű fehérjét a gazdaszervezet ellenálló képessége a neutralizáló ellenanyagok révén eliminálja. Ebben az esetben vírus eredetű antigének nem vagy csak alig jelennek meg a testfolyadékokban. A látens fertőződött macskák rutin ELISA-tesztje – és a párhuzamosan elvégzett IF-vizsgálat is – negatív, de a 4–6 hét múlva ismételt ELISA-teszt gyakran már pozitív eredménnyel zárul, ami viraemiás állapotot jelez. Egyes szerzők ajánlják a kortikoszteroidok immunszuppresszív célból való adagolását a viraemia provokálásának céljából, ez azonban a betegség szétterjedésének veszélyével járhat.

A vizsgálatok
menete

Ellenanyagok (FeLV vagy a FOCMA elleni) kimutatása (vírusneutralizációs vagy indirekt IF-próba)

Az FeLV vagy a FOCMA ellen képződött ellenanyagok titerértékének meghatározására több módszer ismeretes. Ezek rutinszerű alkalmazása mégsem célszerű, mert diagnosztikai értéküket erősen korlátozza a sok befolyásoló tényező (pl. fiatal macskákban a maternális ellenanyagok jelenléte, az idősebbekben az FeLV elleni oltások, a tünetmentes áthangolódás, a nempatogén retrovírusok okozta keresztreakciók, az állatok ellenálló képessége stb.).

FeLV- vagy FOCMA-antigének kimutatása (IF-módszer)

Az indirekt IF-próbák lényege, hogy vérkenetben a fertőzött fehérvérsejtekből, thrombocytákból FeLV eredetű antigéneket vagy FOCMÁ-t mutatunk ki. A vizsgálat eredményei jó összhangban vannak a vírusizolációs eredményekkel, de a módszer kevésbé specifikus.

Vírusantigén kimutatása (ELISA-módszer)

A módosított ELISA-tesztben egy kis edény (az ún. microwell) aljára adszorbeált specifikus ellenanyagok a mintában lévő gp27-es antigént megkötik. Ha az antigén-ellenanyag-komplex képződése végbement, akkor az erre juttatott – komplementet és a tormaperoxidázzal jelzett, gp27 elleni ellenanyagokat tartalmazó – konjugátum egyes részei szintén a kis edény aljára kötődnek. Az edény aljához nem kötődött fölösleges konjugátumot desztillált vizes öblítéssel távolítjuk el. Ezután a kis edénybe cseppentett, színképző szubsztrátoldat az edény aljára kötődött tormaperoxidáz hatására színessé válik.

Enyhe (kétes értékű) színreakció esetén a vizsgálatot 4–6 hét múlva meg kell ismételni.

A nyál- és a könnymintából végzett vizsgálatokhoz könnyebb ugyan a mintavétel, de az eredményeket több zavaró tényező befolyásolja (pl. a nyálka-

hártyák gyulladással járó izladyományokkal, ill. sejtes elemekkel való szennyezett-sége, a nyál viszkozitása). E minták szenzitivitása a szérummintákénak 70%-a.

Hibaforrások. *Tévesen negatív* eredményre vezethet, ha

- az edény (microwell) aljára csak részlegesen kötődtek a komplexek;
- a kellelénél többször vagy túl erősen végeztük az öblítést;
- a mintát hosszú ideig melegben tároljuk (a vizsgált gp27-es core-protein hőlabilis).

Tévesen pozitív eredményt kaphatunk, ha

- mintaként teljes vért vagy erőteljesen hemolitikus plazmát vizsgálunk, és azokat a mikroküvetében nem megfelelően mostuk,
- a konjugátumhoz részlegesen megalvadott vérmintából származó fibrin-szál, esetleg jelen lévő sejtes elemek kötődnek. Ezért inkább szérumot, esetleg alvadásában gátolt vér plazmáját vizsgáljunk. (Megjegyezzük, hogy a macskák esetén a szérum is könnyen hemolitikussá válhat, mivel a macskák vörösvérsejtjei könnyen hemolizálódnak. Ráadásul a macskákból gyakran csak kevés vért tudunk nyerni);
- a macskák vérében lehetnek egérsejtekből származó egyes fehérjék ellen termelt ellenanyagok is (ritkán fordul elő).

Vírusantigén kimutatása (migrációs tesztek)

Az ugyancsak ELISA-módszeren alapuló, egyedi migrációs tesztekkel végzett vizsgálatok költségesebbek. Az FeLV kimutatására összeállított tesztkészleteket gyakran kombinálják a macskák immunhiányos betegségének (FIV) kimutatására célzó reagensekkel, így egy mintából egyidejűleg kétféle vírusfertőzöttség meglétével kapcsolatos információval gazdagodhatunk.

A gp27-es víruskapszid glükoprotein elleni antitesteket (ahogy a chlamydiosis vizsgálatánál is megemlítettük) egy speciális, szivacszerű anyagból készült lemezhez adszorbeálják. A mintában lévő gp27-es antigének az adszorbeált ellenanyagokkal – egy konjugátumokat tartalmazó pufferoldat segítségével – e lemezen belül alkotnak komplexeket. A képződött komplexek a kapillaritás elvén továbbdiffundálnak (migrálnak) a szivacszerű anyagban. A színképző zónához érve a komplex megváltoztatja a zóna színét, s így jelzi a pozitív reakciót.

A tesztek negatív kontrollmezője tartalmazza az esetlegesen egérből származó antigének elleni ellenanyagokat is. Ha a mintában jelen van az egérből származó antigén, akkor a kontrollzóna is elszíneződik, így a pozitív lelet nem feltétlenül igazolja a fertőzöttséget (más típusú víruskimutató módszerhez kell folyamodnunk).

Hibaforrások. Ugyanazok, mint előbb, kivéve a hibás öblítés okozta tévedéseket, hiszen itt öblítést nem végzünk.

Értékelés

© ⊗ Fertőződésmentesnek azok az állatok tekinthetők, amelyek 4–6 hetes időközzel ismételt vizsgálatokban legalább kétszer FeLV-mentesnek bizo-

nyultak. A klinikai tünetektől mentes állatokon egyszeri, szűrővizsgálati jelleggel elvégzett vizsgálat pozitivitása vagy kétes eredménye esetén az állat ivartalanítására, az állományból való végleges kivonására nincs szükség. Ezeket az állatokat el kell különíteni társaiktól, amíg az ismételt vizsgálatot 8–12 hét múlva elvégzik. Az ismételt vizsgálat eldönti, hogy perzisztensen vagy átmenetileg viraemiásak-e az állatok.

A MACSKÁK SZERZETT IMMUNHIÁNY-BETEGSÉGE

A betegség kórokozója vírus (FIV, *feline immunodeficiency virus*). A macskák FIV-vel való fertőzöttségét szűrővizsgálatok céljából, ill. a klinikai tüneteket mutató állatokban a betegség oktani igazolása végett vizsgáljuk.

A FIV-fertőzöttség megállapítására használatos laboratóriumi gyorsdiagnosztikai eljárások a vírusantigének ellen képződött ellenanyagok kimutatásán alapulnak (ELISA-módszer, IF-próba, Western-blot-eljárás). A vírusizolálást megfelelő felkészültségű szaklaboratóriumokban végzik.

Fertőzöttség kimutatása (ELISA-módszer)

A széles körben használatos módszer alkalmas kis laboratóriumok nagyszámú szűrővizsgálatának elvégzésére. A vizsgálat során a FIV gp24-es burokfehérje (más néven: protein-A) vírusantigénje ellen képződött ellenanyagot mutatjuk ki (8.2. ábra).

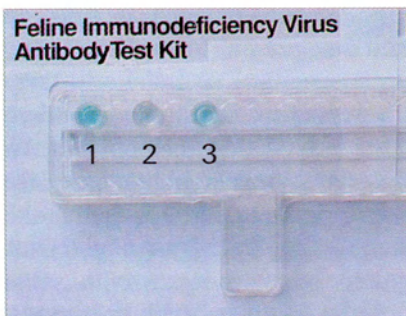
Hibaforrások. Téves szeronegativitás az alacsony ellenanyagszint miatt a fertőzés korai szakaszában lehetséges. A vizsgálatot – a többi szerológiai vizsgálathoz hasonlóan – 4–6 hét múlva ajánlatos megismételni. A kis ellenálló képességű állatok esetén gyakori a tévesen negatív eredmény a T-helper lymphocyták funkciózavara miatt.

Téves szeropozitivitást okozhat

- a macskák spumavírusokhoz tartozó syncytium vírusával (FeSFV, *feline syncytium forming virus*) való áthangolódás,
- a FIV ellen képződött maternális ellenanyagok, amelyek még jelen lehetnek a 4–5 hetes kölyökmacskákban,
- a minta hemoglobinnal, sejtes elemekkel, idegen anyagokkal való szennyeződése.

Bevezető

A vizsgálatok menete



8.2. ábra. FIV-fertőzöttség kimutatása ELISA-módszerrel
1 pozitív kontrollsavó,
2 negatív kontrollsavó,
3 pozitív eredményt mutató minta

Fertőzöttség kimutatása (migrációs teszt, ELISA-módszer)

A tesztekkel többnyire a gp40-es vírusantigén (az ún. transzmembrán-glikoproteid) elleni ellenanyagokat mutatjuk ki a mintákból.

Fertőzöttség kimutatása (Western-blot-eljárás)

A vizsgálatot szaklaboratóriumokban végzik. Az eljárás során a sejtenyeszeten elszaporított vírusok fehérjéit elektroforézissel szétválasztják, és a vizsgálendő savómintával reagáltatják.

Értékelés

☺ ☹ Fertőződésmentesnek azok az állatok tekinthetők, amelyek a 4–6 hetes időközzel ismételt vizsgálatokban legalább kétszer FIV-mentesnek bizonyultak.

A negatív ELISA-teszt melletti sikeres vírusizolálás a korai infekcióval, a sérült immunrendszer „hibás” antitestképzésével vagy laboratóriumi módszertani hibával magyarázható.

A MACSKÁK FERTŐZŐ HASHÁRTYAGYULLADÁSA

Bevezető

A macskák coronavírus okozta hashártyagyulladás (FIP, *feline infectious peritonitis*) esetén az immunkomplexek általánosan a savóshártyákon okoznak elváltozásokat. Klinikailag leggyakrabban a hasúri, ritkábban a mellúri folyadék felhalmozódását látjuk, de ismeretes a folyadékfelhalmozódás nélküli ún. „száraz” forma is.

A diagnosztikai vizsgálat célja:

- a macskák szűrése fedeztetés, kiállítás, adásvétel előtt,
- a fertőzöttség mielőbbi megállapítása,
- a vírusinfekció oktani igazolása a klinikai tünetek megjelenésekor.

A kórjelzés az utóbbi esetben könnyebb, mivel itt más irányú laboratóriumi vizsgálat (hematológia, citológia, szérum-elektroforézis) is segítségünkre lehet.

Biztos kórjelzés csak szövettani vizsgálatokra alapozható, ezért fontos tudnunk, hogy a FIP-vírussal kapcsolatban nincs olyan diagnosztikai eljárás (beleértve a szerológiát is), amely önmagában alkalmas lenne a betegség megállapítására élő állaton.

A FIP vírusa ellen képződött keringő ellenanyagok klasszikus ELISA-, immunfluoreszcens (IF-) és migrációs módszerrel kimutathatók. Mintaként vérsavót, hasúri és mellúri folyadékot vizsgálhatunk, a migrációs teszt esetében tejes vért is használhatunk.

Fertőződés igazolása (klasszikus ELISA- és IF-módszer)

A vizsgálatok
menete

A vírus elleni ellenanyagokat legtöbbször ELISA- vagy IF-módszerrel mutathatjuk ki.

Hibaforrások. *Tévesen negatív* eredményt kaphatunk a betegség letörési szakaszában, amikor

- a főként cachexiás állapotban bekövetkező gyenge ellenálló képesség miatt kevés ellenanyag jelenik meg a testfolyadékokban;
- a savóshártyákon felhalmozódott immunkomplexekben megkötődnek az ellenanyagok, és ezért pl. vérsavóból nem mutathatók ki.

Tévesen pozitív eredmény oka lehet:

- a macskák enterális koronavírusa (FECV, *feline enteral coronavirus*) a FIP vírusával az ELISA- és az IF-vizsgálatokban keresztreakciót ad;
- a szarvasmarha eredetű szérumfehérjéket tartalmazó macskavakcinák ellenanyag-képződést válthatnak ki a macskákban, amelyek a koronavírussal szemben termelt ellenanyagokkal keresztreakciót adhatnak (a vakcinázás utáni 3–4 hónapban tapasztalható).

Ha egy macska első vizsgálata a coronavirus-fertőzöttségre nézve pozitív, és az ismételt vizsgálat során a titerérték nem változik, azt magyarázhatja kevésbé patogén, apatogén (pl. a FIP-vakcina) vagy enterális koronavírussal történt áthangolódás. Ha perzisztensen nagy vagy növekvő titerértéket tapasztalunk, akkor a betegség klinikai tüneteinek megjelenésére lehet számítani.

Fertőződés igazolása (migrációs tesztek)

A lemez rekombináns coronavirus-specifikus fehérjét tartalmaz, ami kapcsolódni képes a mintában lévő ellenanyagokkal, s így kialakul a színreakció. (A módszerről ➔ FeLV, 322. o.)

Hibaforrások. *Tévesen negatív* eredményt adhat, ha

- a minta hemolizált;
- a migráció nem megfelelő a lemezen a mintákban lévő fibrinszálak, esetleg a sejtes elemek miatt, ill. a folyadékgyülemből származó minták esetén a nagy viszkozitás hatására (ilyenkor a mintát élettani NaCl-oldatban oldani kell);
- a punktátumban lévő immunkomplexek zavarják a színeképződést.

Tévesen pozitív teszteredményt az ELISA- és az IF-módszernél leírt tényezők okozhatnak.

☺ ☹ A 4–6 hetes időközzel kapott negatív eredmény *fertőződésmentes*re utal. A pozitív eredmény azonban a zavaró tényezők miatt nem feltétlenül jelent biztos fertőzöttséget.

Értékelés

SZOPORNYICA

Bevezető A betegség kórokozója a szopornyicavírus. A bizonytalan oltási előzményű és határozatlan idegrendszeri tüneteket mutató kutyák esetén a szopornyicavírus-fertőzöttség kimutatására vérből, orrváladékból, könnyből, a nyálkahártyák sejtjeiből, ill. liquorból végezhetünk vizsgálatokat.

A vizsgálat menete A vírusizolálás, a vírusneutralizációs próba, a zárványkimutatásra irányuló festési eljárás mellett inkább szaklaboratóriumban végzik a vírus immunfluoreszcens (IF-) módszerrel való kimutatását. A vírusneutralizáló ellenanyagok kimutatása során a vérsavóból IgG és IgM típusú ellenanyagokat mutatunk ki. Ez esetben javasolt a savópárok vizsgálata. A festési eljárás a hematológiában általánosan alkalmazott festési eljárásokkal csak heveny esetekben végezhető. A módszer sok hibalehetőséget rejt magában.

Az IF-vizsgálat során a szopornyicavírus ellen termelt, fluoreszkáló festékhez kapcsolt ellenanyagok kötődnek a különböző sejteken belül megjelenő vírusokhoz. Mintának alkalmas sejteket a kötőhártyáról, a szájnyalkahártyáról, a centrifugált, heparinos vérminta fehérvérsejtgyűrűjéből (thrombocyták, lymphocyták, monocyták), a légcső vagy a hörgő faláról gyűjthetünk.

Hibaforrások

- A vírusneutralizáló ellenanyagok kimutatásakor *tévesen negatív* eredményt kaphatunk a betegség előrehaladott stádiumaiban, amikor az ellenanyagképzés csökken. *Tévesen pozitív* eredmény születhet, ha a szérum vérsejtekkel kontaminálódik, vagy ha a vizsgált állat 5–6 hónapon belül védőoltásban részesült. Tapasztalatok szerint azonban a védőoltás hatására az IgG-titerértékek az IgM-titerértékeknél nagyobbak, míg a „vadvírussal” való fertőzöttség esetén ez fordítva tapasztalható.
- A szöveti sejtekből származó mintákat vizsgálva *tévesen negatív* eredményt kaphatunk a betegség idült és idegrendszeri formáinak esetében, ugyanis a szervezet áthangolódása következtében vírusneutralizáló ellenanyagok képződnek, amelyek eliminálják a vírusokat, bár a légcső és a hörgők falából származó sejtekben a tapasztalatok szerint hosszabb ideig maradnak kimutathatók a vírusok. *Tévesen pozitív* lehet az eredmény a vizsgált sejteket szennyező anyagok miatt.

Értékelés ☺ ☹ A vírusneutralizáló ellenanyagok kimutatási próbáiban a 4–6 hetes időközzel kapott kétszeri negatív eredmény *fertőződésmertességre* utal. A pozitív eredmények *szopornyicafertőzöttséget* jelentenek.

A KUTYÁK PARVOVÍRUSOK OKOZTA BÉLGYULLADÁSA

A parvovírus okozta enteritis főleg fiatal (néhány hónapos), fogékony kutyák súlyos betegsége. Egyes kutya fajtákban a kórkép súlyosabb lefolyású, mint másokban.

A szerológiai vizsgálat a *bélsárban* jelen lévő parvovírus-antigének kimutatásán alapul. Korábban, 8–10 éve főként hemagglutináció-gátláson alapuló vizsgálatokat végeztek, ma a pontosabb és egyszerűbb ELISA-módszer használata terjedt el. A szerológiai rutinmódszerek hátránya, hogy nem tesznek különbséget a kutya parvovírus (a kevésbé patogén CPV-1 és a patogén CPV-2) szerotípusai között. Hasonló módszerekkel lehet igazolni a macskák parvovírus-fertőzöttségét (az ún. panleukopeniát) is.

Bevezető

Fertőzöttség kimutatása (hemagglutináció-gátlási próba)

A vizsgálatot általában szaklaboratóriumok végzik, a parvovírusok ellen késződött ellenanyagokat mutatják ki vérsavóból sertés vörösvérsejtek felhasználásával. Az ellenanyagok a fertőződés 3. napjától kimutathatók, és a 7. napra már kifejezett titerérték-növekedés tapasztalható; a megnövekedett titerérték diagnosztikai értékű.

A vizsgálatok menete

Fertőzöttség kimutatása (ELISA-módszer)

A módszerrel a bélsármintáékban előforduló vírusantigének mutathatók ki pl. microwell-technikával (☛ FeLV, 323. o.).

Hibaforrások. *Tévesen pozitív* eredményt kapunk, ha

- a minta vérrel, hemoglobinnal vagy gyulladós izzadmánnyal szennyezett,
- a pufferoldatos hígítás nem volt megfelelő.

Tévesen negatív lesz az eredmény, ha a mintavétel a fertőzést követő 3. napnál később történt, mivel a vérben keringő vírusneutralizáló ellenanyagok a sérült bélnyálkahártyán keresztül a vérrel együtt a lumenbe kerülve eliminálják az ott lévő vírusokat.

Fertőzöttség kimutatása (migrációs tesztek)

A vizsgálatot az alkalmazott tesztkészlethez tartozó pufferoldattal előkészített bélsármintából végezzük.

Hibaforrások. *Tévesen pozitív* vagy *tévesen negatív* eredményt az ELISA-módszernél leírt esetekben kaphatunk. *Tévesen negatív* eredményt okozhat továbbá a minta nem megfelelő migrációja.

Értékelés

☺ ☹ A 4–6 hetes időközzel kapott kétszeri negatív eredmény *fertőződésmertességre* utal. A pozitív eredmények *parvovírussal való fertőzöttséget* jelentenek.

TOXOPLASMOSIS**Bevezető**

Az állatorvosi gyakorlatban indokolt lehet a gyakran változatos tüneteket (szemtüneteket, neurológiai stb. kórformákat) mutató macskák és a főként neurológiai tüneteket mutató kutyák toxoplasmosis-fertőzöttségének vizsgálata. Számítani lehet arra, hogy állatokkal (főként macskákkal) kapcsolatban lévő embereket (terhes nőket, immunzuppresszált egyéneket, AIDS-fertőzötteket stb.) a humánorvos kollégák az állatorvoshoz küldik abból célból, hogy ellenőriztessék állataikat a *Toxoplasma gondii*-fertőzöttség szempontjából. Az állatok fertőzőképességének felismerésére elsősorban az oocysták bélsárból való parazitológiai vizsgálat javasolható, a *Toxoplasma gondii*-fertőzöttségre utal a kórokozó festéssel való kimutatása, amelynek a lényege, hogy a fertőzött szövetekből (pl. tüdő, máj, savóshártyák, liquor) a tachyzoitákat mutatjuk ki. Többféle immunológiai módszer ismeretes, így a toxoplasma eredetű antigén, a toxoplasma elleni ellenanyagok és a toxoplasma-specifikus immunkomplexek kimutatása. Mindhárom eljárás szakkabatóriumban végezhető.

A vizsgálatok menete**Antigének kimutatása (ELISA-módszer)**

Az állatok vérsavójában, agyfolyadékában, a szem különböző váladékaiban (pl. könny) klasszikus ELISA-módszerrel *Toxoplasma gondii*-antigének mutathatók ki. A fertőződéstől számított 1. héten belül nagyszámú toxoplasma eredetű antigén juthat a keringésbe. Egyes egyedekben a keringő antigének hosszú ideig periodikusan jelennek meg. Gyakori, hogy az antigének megjelenését nem azonnal követi az ellenanyagok megjelenése.

Hibaforrások. *Tévesen negatív* eredmény kaphatunk a toxoplasmák kiváltotta immunkomplex-képződés miatt, mivel az antigének megkötődnek.

Ellenanyagok kimutatása (ELISA-módszer)

A kórokozóspezifikus ellenanyagokat a vérsavóból, a liquorból és a könnyből lehet kimutatni. A fertőződéstől számított 2–4 héten belül a macskákban a kórokozóspezifikus IgM titernövekedése tapasztalható, ami friss fertőzésre utal. Az emelkedett értékek általában a 12. hétig mutathatók ki, a FIV-fertőzött állatokban azonban hónapokig is megfigyelhetők.

A vérben a fertőződést követő 3. héten belül emelkedő IgG-titer évekig is perzisztálhat, így az IgG-pozitivitás csak a fertőzöttséget jelenti, és nem igazolja magának a betegségnek a fennállását. A savópár vizsgálatával kapott,

az eredetihez képest négyszeres IgG-titerérték-növekedés azonban aktív fertőzöttséget jelez.

Hibaforrások. A *tévesen negatív* eredmények okai:

- friss fertőzöttség (amikor még nem volt idő az áthangolódásra),
- a mérsékelt ellenanyagképzés az állatok gyenge immunválasza miatt,
- a cystákban nyugvó állapotban lévő kórokozók nem váltanak ki ellenanyag-termelést,
- a különböző eredetű immunkomplex-képződéssel járó kórformák.

Specifikus IgM- és IgG-immunkomplexek kimutatása (ELISA-módszer)

A *Toxoplasma gondii* ellen képződött IgM és IgG típusú ellenanyagok a vérkeringésben a kórokozó antigénjeivel immunkomplexeket képezhetnek, amelyek ELISA-módszerekkel vizsgálhatók. A vizsgálat vérsavóból, szemcsarnokvízből, egyéb szemváladékokból és liquorból végezhető.

Indokolt az immunkomplexek és az ellenanyagok jelenlétének párhuzamos vizsgálata, mivel az immunkomplexek képződése zavarja az antigének és az ellenanyagok kimutatását.

☹ ☹ A negatív teszteredmények *fertőződésmertességre* utalhatnak. A pozitív teszteredmények *fertőzöttséget* jelentenek.

Értékelés

LYME-BORRELIOSIS

A Lyme-kór állatokban és emberekben egyaránt előforduló, hazai viszonyok között a *Borrelia burgdorferi* baktérium által okozott kórkép (zoonosis). A Lyme-borreliosis kimutatását célzó módszert akkor alkalmazzuk, ha az állatokban bizonytalan eredetű lázas állapot, ízületigyulladás, központi idegrendszeri tünetek, esetleg urticariaszerű bőrelváltozások jelentkeznek. A fertőződés igazolását az egyéb spirochaetákkal fennálló antigénrokonság nehezíti. A kórokozó, bár tenyésztése nehéz, mikroszkópos és immunfluoreszcens (IF-) módszerekkel, az erre felkészült laboratóriumokban a bőrből az ízületi váladékból, a liquorból stb. kimutatható. A leggyakoribb kimutatási módszerek azonban ellenanyag-kimutatáson alapulnak. Ezekre a vizsgálatokra a vérsavó, az ízületi váladék és a liquor alkalmas.

Bevezető

Ellenanyagok vizsgálata (microwell-módszer)

A vizsgálat a vérsavóban megjelenő *B. burgdorferi* antigének ellen képződött IgG típusú ellenanyagok kimutatását szolgálja. A módszer értékelését keresztreakciók nehezítik. A vizsgálat során titerértékeket nem kapunk, csak pozitív vagy negatív eredményt.

A vizsgálatok menete

Ellenanyagok vizsgálata (passzív hemagglutinációs próba)

A vérsavóban megjelenő ellenanyagokat juh vörösvérsejtekhez kötött *B. burgdorferi* antigének alkalmazásával mutatjuk ki, amit a vörösvérsejtek agglutinációja jelez. A nem specifikus reakciókat kontrollantigén és -savók vizsgálatával zárjuk ki.

A módszer *előnye*, hogy a titerértékek is meghatározhatók; *hátránya* viszont, hogy nem tehető különbség a különböző típusú (IgG, IgM, IgA) ellenanyagok között. A vizsgálat kivitelezése laboratóriumi szakismereteket követel. További hátránya, hogy a teszt keresztreakciót adhat más, főképp spirochaeta baktériumokkal, amelyek a száj- vagy a bélflóra élettani alkotóelemei is lehetnek.

Ellenanyagok vizsgálata (Western-blot-eljárás)

Bár ez a vizsgálómódszer a legmegbízhatóbb, még a humánorvosi rutindiagnosztikában is csak szaklaboratóriumokban alkalmazzák Magyarországon.

Értékelés ☺ ☹ A negatív eredmények *fertőződésmertességre*, a pozitívok *B. burgdorferi-fertőzöttségre* utalnak.

A gombás betegségek laboratóriumi vizsgálata

A gombás betegségek és csoportosításuk

A gombás eredetű megbetegedések között a kórfolyamatok alapján *mikózisok*, *mikotoxikózisok* és *gomba eredetű allergiák* különböztethetők meg. A továbbiakban az állatok mikózisait okozó gombák laboratóriumi diagnosztikájával foglalkozunk.

A gombákat tenyésztési és morfológiai tulajdonságaik alapján két csoportba sorolhatjuk: *élesztőgombák* és *penészgombák*. Az élesztőgombák sejtjei ovális vagy megnyúlt alakúak, 3–5 µm nagyságúak. Laboratóriumi táptalajon nedves, baktériumszerű telepeket képeznek, sarjadzással szaporodnak. A penészgombák vagy fonalas gombák hyphái 2–10 µm szélességűek, szövedékük a micélium. A penészgombák nagy, vattaszerű telepeket képeznek a táptalajon, és ivartalan szaporítóképleteik alapján különíthetők el. Néhány patogén gomba az ún. *dimorf gombák* csoportjába tartozik. Jellemzőjük, hogy a szervezetben és laboratóriumi körülmények között 37 °C-on élesztőszerűen, a környezetben és 25 °C-on penészszerűen növekednek.

Az állatok patogén gombák okozta megbetegedéseit a következőképpen csoportosíthatjuk:

- *felületi mikózisokat* idéznek elő
 - ♦ a fonalas dermatophytonok (*Microsporum* és *Trichophyton* fajok),
 - ♦ az élesztőgombák közé tartozó *Malassezia pachydermatis*,
 - ♦ elvételre pedig egyéb élesztőgombák (pl. *Trichosporon* és *Candida* fajok);
- *szubkután és belső szervi mikózisokat* okozhatnak
 - ♦ az élesztőgombák (pl. *Candida* fajok, *Cryptococcus neoformans*),
 - ♦ a dimorf gombák (pl. *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) és
- a penészgombák (pl. *Aspergillus* és *Mucor* fajok).

A hazánkban leggyakrabban előforduló mikózisok (☞ 8.8. táblázat, 347. o.):

- a kutyák, a macskák, a tengerimalacok, a lovak és a szarvasmarhák *dermatophytonok* okozta dermatomikózisa,
- a kutyák és a macskák *Malassezia pachydermatis* eredetű otitis externa és dermatitise (8.3. ábra),



A vizsgálatokról általában

8.3. ábra. *Malassezia* okozta dermatitis magyar vizslában

- a macskák, a kutyák és az állatkerti állatok bőr- és nyálkahártya-*Candida asisa*,
- a díszmadarak *Candida* fajok okozta begymikózingisa,
- a pulyka, a csibe, a liba és a kacska *Aspergillus* és *Mucor* fajok okozta tüdő- és légzsákmykózingisa,
- a lovak légzacskómykózingisa.

A mykózingisok diagnosztikájában kiemelkedő szerepe van a laboratóriumi vizsgálatoknak. A gombák egyes baktériumokkal és/vagy ektoparazitákkal való társulása következtében egyre gyakoribb a betegségek tüneteinek elmosódása és jellegtelenné válása. A gombák antifungális szerek iránti érzékenysége is jelentősen eltérhet. Így hatékony gombaellenes terápia csak biztos laboratóriumi diagnózingis alapján valósítható meg.

A mintáról általában

Mykózingisok gyanúja esetén az élő állatból származó különféle klinikai mintákat (bőrkaparék, karomdarabok, liquor, tej, vizelet, bélsár, bióptátum) különféle helyekről (külső hallójárat, orrűreg, kötőhártyazsák, száj- és garatűreg, hüvely, tasak, végbél) vett váladékokat, elhullott állatból a kórboncoláskor vett szervmintákat egyaránt vizsgálhatunk.

A mintavétel

Bőrkaparékmynta-vétel. Mintavétel előtt az elváltozást mutató területet 70%-os etil-alkohollal töröljük le a szennyeződések eltávolítására. A levett mintát tegyük steril kémcsőbe, fecskendőbe vagy több rétegben összehajtott papiros közé. A *Microsporum* és a *Trichophyton* fajok elsősorban a szőrszál bőr feletti 3–5 mm-ében és a szőrtűsződben, a *Malassezia pachydermatis* élesztőgombák elsősorban a bőrpikkelyeken szaporodnak. Ezért a bőrkaparékmynta vétele kissé eltér a parazitológiai vizsgálat mintavételétől (☛ 370. o.). Dermatomykózingis gyanúja esetén a frissen keletkezett, elváltozást mutató területek széli részéről származó, a szőrtűsződből kitépelt (és nem lenyírt) szálak, lekapart bőrpikkelyek és felrakódások egyaránt szükségesek. Nehezen hozzáférhető helyről – pl. a szem környéke, ajakszél – úgy vehetünk mintát, hogy celluluszsalagot nyomkodunk az elváltozást mutató területhez, majd leégetett tárgylemezre ragasztjuk azt.

Köröm- vagy karommynta vétele. Onychomycosis gyanúja esetén az egészséges körömrészhez közeli területről ollóval vágunk ki egy kis darabot. A megbetegedést dermatophytonok és élesztőgombák egyaránt okozhatják, ezért a többirányú vizsgálat miatt több beteg körömrészletre van szükség.

Tej-, bélsár-, vér- és liquormynták vétele. *Tejmyntavétel* előtt mossuk le a csecsbimbókat 70%-os etil-alkohollal, majd töröljük szárazra. Mastitis esetén az első tejsugarakat fejjük vagy masszírozunk ki, és a következő sugarakat gyűjtjük a steril mintavételi csőbe.

Bélsármyntát vehetünk tégelybe, de ha gombák okozta enteritisre gondolunk, elegendő a végbélből tamponnal vett mynta is.

Vér- és liquormyntavétel előtt a bőrt alaposan fertőtlenítsük. A vérmynta

vételét 24 óra alatt lehetőleg többször ismételjük meg. A vér és a liquor mikológiai vizsgálatára akkor van szükség, ha szisztémás mikózis (candidiasis, cryptococcosis) gyanúja áll fenn. A liquorban *Cryptococcus neoformans* kimutatása diagnosztikai értékű. Szisztémás megbetegedés gyanúja esetében hemokultúrát is készíthetünk.

Váladékminták vétele. *Mintavétel otitis externa esetén.* A külső hallójáratból steril élettani nátrium-klorid-oldattal benedvesített tamponnal vegyünk mintát, mert száraz tamponnal a hallójárat falán mikrosérüléseket okozhatunk. A tamponokat steril kémcsőbe vagy fecskendőbe helyezzük, és jól lezárjuk, hogy óvjuk a kiszáradástól. Az egészséges hallójárat mikroflóráját főként koagulázpozitív staphylococcusok, nem hemolizáló streptococcusok, valamint a *Malassezia pachydermatis* élesztőgomba alkotja. Otitis externa esetében leggyakrabban a *Malassezia pachydermatis*, a *Candida* és az *Aspergillus* gombafajok tenyésztethetők ki. A fülváladék mikroszkópos vizsgálatának *Malassezia* esetében diagnosztikai értéke van, mivel a jellegzetes, palack alakú élesztőgombák a mikroszkóp kisebb nagyításánál is jól felismerhetők (8.4. ábra).

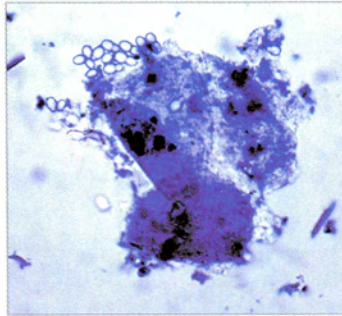
Mintavétel nyálkahártyákról. A kötőhártyáról, az orrüregből, a száj- és a garatüregből, a nemi szervek nyálkahártyáiról steril élettani NaCl-oldattal benedvesített tamponnal vegyünk mintát, amit óvjunk a kiszáradástól, és lehetőleg 2 órán belül juttassuk el a laboratóriumba.

A conjunctivitis kóroktanában előforduló élesztőgombák (pl. *Malassezia* és *Candida* fajok) és penészgombák (pl. *Aspergillus* fajok) ugyan nem érzékenyek a kiszáradásra, egyes baktériumok azonban (pl. *Moraxella* és *Streptococcus* fajok) hamar elpusztulhatnak.

Kutyák nem gyógyuló rhinitise esetében gondoljunk az *Aspergillus* penészgombák előfordulására is.

Ha a hüvelyből veszünk mintát, kerüljük a külső nemi tájékkal, esetleg a bőrrel való érintkezést. A mintát a vestibulumból vagy a vagina hátsó részéből vegyük. A kutyák hüvelye nem steril, az ott élő baktériumok és élesztőgombák egymással egyensúlyban alkotják az élettani flórát. A vagina caudalis része több mikroorganizmust tartalmaz, mint a cranialis. A gyulladás kialakulásának oka leggyakrabban valamiféle hajlamosító tényező hatására az ubiquitaer mikroorganizmusok, elsősorban baktériumok (staphylococcusok, streptococcusok, coliformok), valamint élesztőgombák (candidák, malasseziák) elszaporodása. Hím kutyáknál a penisnyálkahártya gyulladása, valamint a praeputium gyulladása során izolálhatunk *Candida* és *Malassezia* élesztőgombákat.

Ezek a gombák előszeretettel fordulnak elő a *perianalis mirigyek* gyul-



8.4. ábra. *Malassezia pachydermatis* jellegzetes alakú sejtjei. Metilénkékfestés fülváladékból

ladása során, mely mirigyekből a váladék mennyiségétől függően fecskendővel vagy tamponnal vehetünk mintát.

Mintavétel tályogokból. A mintavétel során ügyeljünk arra, hogy az abscessus közepén a váladék általában már steril. Ezért lehetőleg a tályog falának megkaparásával a széli részről vegyünk néhány tized ml mintát.

A minták tárolása, szállítása

A *bőrkaparékmintákban* (a fertőzött szőrszálakban és bőrpikkelyekben, körömdarabkákbán) a *Microsporum* és *Trichophyton* fajok spórái akár 6–12 hónapig is életképesek maradnak, így a fertőzöttség a mintákból hosszú ideig megállapítható. Ezek a minták különleges tárolást (pl. hűtés) nem igényelnek, célszerű azonban száraz helyen tárolni őket a nedves körülményeket kedvelő penészgombák elszaporodásának gátlása érdekében.

A külső hallójáratból, a kötőhártyáról, a hüvelyből, a végbélből, a perianalis mirigyekből vett *váladékmintákat* óvni kell a kiszáradástól. A tamponnal vett vagy a steril kémcsőbe, fecskendőbe helyezett egyéb mintát lehetőleg még a mintavétel napján küldjük laboratóriumi vizsgálatra. Amennyiben ez nem lehetséges, a mintát a mikroorganizmusok elszaporodásának gátlása miatt másnapig hűtőszekrényben +4 °C-on tároljuk. A vizelet- és liquormintákat a mintavételt követő 2 órán belül juttassuk laboratóriumba, addig +4 °C-on tároljuk.

A *tejmintát* a laboratóriumba szállításig tegyük +4...+8 °C-os hűtőszekrénybe.

Ha a mintákat más laboratóriumba (diagnosztikai intézetbe) küldjük vizsgálatra, akkor az előbbieken említett szempontok figyelembevételével juttassuk el a vizsgálóhelyre. A váladékmintákat a hosszabb időt igénylő szállítás során (pl. posta) helyezzük szállító táptalajba.

MAKROSZKÓPOS KIEGÉSZÍTŐ VIZSGÁLATOK – A WOOD-LÁMPÁS VIZSGÁLAT

Bevezető

Az állat testfelületén kialakuló és lassan terjedő, kerek vagy szabálytalan szélű, szőrhányos, esetleg korpázó bőrterületek már felkeltik a gombás megbetegedés gyanúját. Ilyen esetekben az elváltozott területet megvizsgálhatjuk az ún. Wood-lámpával.

A vizsgálat menete

Mi kell hozzá?
Wood-lámpa

A makroszkópos mikológiai vizsgálat során vagy közvetlenül az állatokon lévő elváltozásokat figyeljük meg (az állat szemét le kell takarni), vagy a bőrkaparékmintákat helyezzük a lámpa alá. A vizsgálatot 330–365 nm hullámhosszúságú ultraibolya (UV-) fényt adó *Wood-lámpával*, esetleg bankjegyek vizsgálatára használatos UV-lámpával, sötét szobában hajtjuk végre.

A Wood-lámpás megfigyeléskor *Microsporum canissal* vagy *Microsporum equinummal* fertőzött területeken a szőr kékeszölden fluoreszkál a gombák termelte pteridin miatt.

Hibaforrások. A kékeszöld fluoreszcencia nem minden törzs esetében figyelhető meg (a módszer hatékonysága saját vizsgálataink és irodalmi adatok alapján kb. 20–25%-os). *Tévesen pozitív* eredményt adhat a különféle gyógszerek (pl. tetraciklinek) és fertőtlenítőszeres (jód) hatására kialakuló nem specifikus fluoreszcencia; *tévesen negatív* eredményt kaphatunk az elváltozott területek alkohollal való letörlését követően is.

- ☉ A negatív vizsgálati eredmény még nem zárja ki a gombával való fertőzöttség lehetőségét, ezért vegyünk bőrkaparék-mintát, és azt tovább vizsgáljuk.
- ☉ A pozitív vizsgálati eredmény felveti egyes *Microsporum* fajokkal (pl. *Microsporum canissal*, *Microsporum equinummal*) való gombafertőzöttség lehetőségét. A fertőzöttség biztos megállapítása azonban csak egyéb vizsgálatok elvégzését követően lehetséges.

Értékelés

MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

A mikroszkópos mikológiai vizsgálatok célja mikózisok gyanúja esetén az előzetes és gyors tájékozódás. A mintát először a megfelelő táptalajokra (a sterilítésre vigyázzni!) oltjuk, és a megmaradó mintából végezzük el a mikroszkópos kiegészítő vizsgálatokat.

A mikroszkópos vizsgálat előkészítése során a mintákból tárgylemezen preparátumokat készítünk a következő eljárásokkal:

- *festések* (pl. metilénké- és Giemsa-féle festés, tusfestés) – ezzel a módszerrel váladékokat vizsgálunk élesztőgombák jelenlétére, vagy a kálium-hidroxiddal feltárt bőrkaparék-minták kontrasztfestését végezzük el;
- *feltárások* (pl. kálium-hidroxidos feltárás) – ezt a módszert bőrkaparék-minták feltárásához alkalmazzuk, hogy a fehérjetartalmú anyagok roncsolásával a dermatophytonok spóráit felismerhetőbbé tegyük;
- *egyéb specifikus mikroszkópos vizsgálatok* (pl. fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat calcofluor white ipari fehérítő segítségével) – ezzel a módszerrel a mintából valamennyi gombasejt kimutatható.

A készítményekhez váladékokból egy cseppre, bőrkaparék-minták esetében az elváltozott területről származó sérült és kitépelt szőrszálakra, bőrpikkelyekre, felrakódásokra és esetleg karom- vagy körömdarabokra van szükség.

Metilénkéoldat készítése: 2 g metilénkéket feloldunk 100 ml desztillált vízben. Az oldódás után az oldatot szűrőpapíron átszűrjük.

Giemsa-féle oldat készítése: 4 ml Giemsa-törzsoldathoz (gyógyszertárban kapható) 4 ml 96%-os etil-alkoholt és 72 ml desztillált vizet adunk, és az oldatot lassan melegítjük. Az oldat homogénné válását követően adjuk hozzá a 0,05 g gyapoptkéket (anilinkéket).

Bevezető

A vizsgálatok menete

Mi kell hozzá?
Mikroszkóp
(sima és fluoreszcens feltéttel),
nedveskamra,
festékoldatok,
10%-os kálium-hidroxid-oldat,
calcofluor white
munkaoldat

Tusfesték készítése: 1 ml fekete tusfestéket (Pelikán) elegyítünk 9 ml 40%-os formaldehidoldattal.

10 %-os kálium-hidroxid- (KOH-) oldat készítése: a kereskedelmi forgalomban lévő KOH-kristályokból 10 g-ot 100 ml desztillált vízhez adunk, majd a teljes oldódásig az oldatot kavargatjuk. Az oldatot hetente frissen készítjük.

Calcofluor white fluoreszcens oldatok készítése: 1%-os törzsoldat készítéséhez 1,0 g calcofluor white-ot desztillált vízben feloldunk. Az oldatot enyhén melegítjük, majd kihűlés után a térfogatot 100 ml-re egészítjük ki. A törzsoldatot fénytől védve, jól lezárva tároljuk. A törzsoldat 10-szeres desztillált vizes hígításával készítjük a 0,1%-os munkaoldatot. Hetente készítünk friss munkaoldatot.

A preparátumok készítése és festése

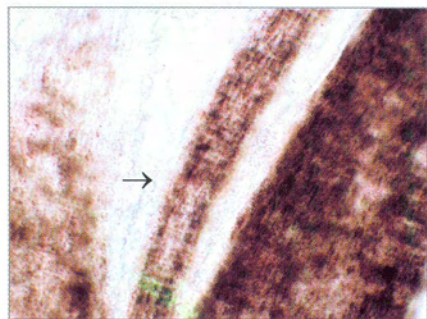
Metilénkék- és Giemsa-féle festés. A tárgylemezeket megtisztítjuk (zsírtalanítjuk), és használat előtt Bunsen-éggel leégetjük. A tamponmintákat közvetlenül a tárgylemezhez nyomkodjuk, a váladékmintából pedig egy cseppet helyezünk a tárgylemezre. Rácseppentünk egy csepp 2%-os metilénkék- vagy Giemsa-féle oldatot, fedőlemezrel lefedjük, majd mikroszkóppal vizsgáljuk. A háttér kékre festődése megkönnyíti a preparátum értékelését.

Tusfestés. A cerebrospinalis folyadékot, egyéb biológiai váladékot vagy tejmintát tárgylemezre visszük, tussal megfestjük, majd mikroszkóppal vizsgáljuk.

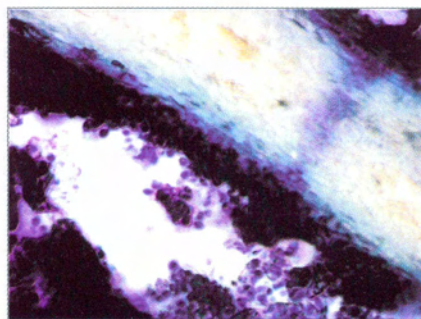
A preparátumok készítése feltárással

Kálium-hidroxidos (KOH) feltárás. A mintákban lévő gombasejtek biztonságosabb kimutatására végezzük a feltárást. A zsírtalanított és leégetett tárgylemezre 1–2 csepp 10%-os KOH-oldatot cseppentünk, és csipesszel beleteszünk szűrőszálakat, bőrpikkelyeket. A tárgylemezt Bunsen-éggő fölött néhányszor óvatosan végighúzzuk (gőzölgésig), és fedőlemezrel helyezünk rá. A preparátumot néhány órára vagy egy éjszakára nedveskamrába téve a preparátum jobban feltisztul, mivel a KOH roncsolja a fehérjetartalmú részeket. A készítményt fény- vagy fáziskontraszt-mikroszkóppal vizsgáljuk (8.5. ábra). A KOH-dal

8.5. ábra.
Microsporum canis-spórák kálium-hidroxiddal kezelt szűrőszálak között



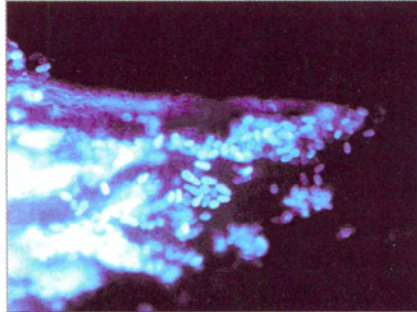
8.6. ábra.
Microsporum canis-spórák metilénkékkel festett preparátumban



kezelt készítményre 2%-os metilénkékoldatot is cseppenthetünk, ez kontrasztossá teszi a preparátumot, az elhalt sejtek kékre festődnek, ami elősegíti az értékelést (8.6. ábra).

Hibaforrások. A preparátumok elkészítése körültekintést igényel, mivel nem kellő hőhatás esetén pl. a zsírcseppek, túlhevítés esetén pedig a képződő KOH-kristályok nehezítik meg az értékelést. A gyakorlatlan bírálót megtéveszthetik a készítményben lévő koleszterinkristályok vagy vattaszálak is.

Kálium-hidroxidos feltárás és calcofluor white fluoreszcens vizsgálat. A calcofluor white (CW) olyan ipari fehérítésre alkalmazott vegyület, amely specifikusan kötődik a β -konfigurációt mutató poliszacharidokhoz, így pl. a gombasejtek falában lévő kitinhez. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a nem kötődött calcofluor white 1–2 percen belül elveszti fluoreszcenciáját, a gombasejtekhez transz-izomer formában kötődő calcofluor white azonban 520 nm hullámhosszúságú fényrel megvilágítva erős kékeszöld fluoreszcenciát mutat. A zsírtalanított és leégetett tárgylemezre 1–2 csepp 10%-os KOH-oldatot cseppentünk, majd behelyezzük a mintát, és a preparátumot egy napig nedveskamrában feltárjuk. A vizsgálat előtt a preparátumra 1 csepp 0,1%-os CW-oldatot cseppentünk, és fedőlemezzel lefedjük, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk (8.7. ábra).



8.7. ábra. Calcofluor white-kezelés eredménye. A *Malassezia* gombák fluoreszcens feltétű mikroszkóppal vizsgálva kékeszöld színnel világítanak

☺ ☹ Az élesztőgombákat, a dermatophytonok vagy penészgombák fonalait és spóráit már 150×-es nagyítással is láthatjuk, mivel az élesztősejtek mérete általában 3–5 μm , és kb. ilyen vastagságúak a hyphák is.

A metilénkék- és Giemsa-féle festéssel készített preparátumok a háttér kékre festődése révén könnyen értékelhetők. A metilénkékes készítményekben az elhalt baktériumok és gombák is kékre festődnek. A módszer elsősorban fülvuladék (l. a 8.4. ábrát), vér, vizelet és hüvelyvuladék vizsgálatára ajánlható, a dermatophytonok kimutatására nem megbízható módszer (l. a 8.6. ábrát).

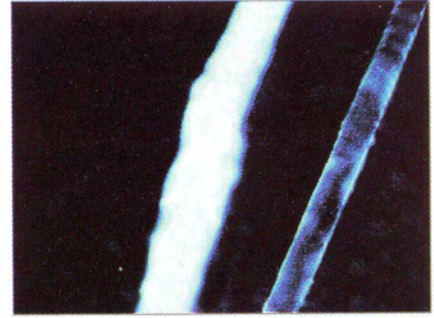
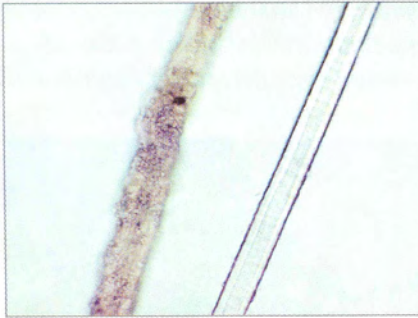
A tusfestéssel készített preparátumokból az állatokban és az emberben egyaránt súlyos szisztémás mikózist okozó *Cryptococcus neoformans* élesztőgomba mutatható ki (Giemsa-féle és nigrozinfestés is alkalmazható). Jól látható a gomba jellegzetes, 5–20 μm átmérőjű mukopoliszacharid tokja.

A kálium-hidroxidos feltárással készített preparátumokat elsősorban a dermatophytonok okozta fertőzöttséget megállapítására alkalmazzuk (l. a 8.5. ábrát). A készítményt 300–1000×-es nagyítással vizsgáljuk (az elbírálás hatékonysága kb. 45%). Klinikai mintákban általában hypharészek, spórák és sarjadzó sejtek találhatóak. A *Microsporum canis* spórái jellegzetes,

Értékelés

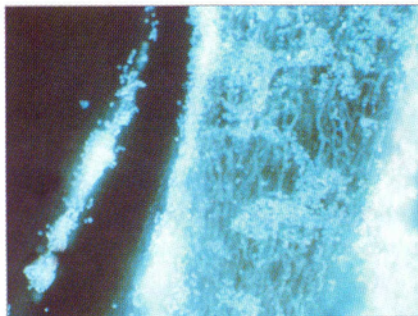
2–3 μm átmérőjű, kerekded képletek formájában láthatók, amelyek több sorban körülveszik a szőrszálát (8.8a ábra). A *Microsporium gypseum* és a *Trichophyton mentagrophytes* spórái valamivel nagyobbak (5–8 μm), és egy rétegben, általában szabályos láncokba rendeződve helyezkednek el a szőrszálon.

8.8. ábra.
Microsporiummal
fertőzött és egész-
séges szőrszál
a) kálium-hidroxi-
dosos feltárás;
b) calcofluor white-
kezelés



A calcofluor white-tal készített preparátumokat fluoreszcens mikroszkópban az 520 nm-es tartományban (UV-fény) vizsgáljuk. A gombasejtek és hyphák kifejezett kékeszöld fluoreszcenciát mutatnak a hozzájuk *transz*-izomer formában kötődött CW miatt, míg a nem kötött CW fluoreszcenciája 1–2 másodpercen belül eltűnik. Bár a módszer nem specifikus (a CW valamennyi gombasejthez kötődik), a gyakorlott bíráló meg tudja állapítani a nem-

8.9. ábra.
Trichophyton
*equinum*mal fertő-
zött szőrszál.
A szőrszálát teljesen
kitöltik a gomba
fonalai és spórái
(calcofluor white-
kezelés)



zetséget a gombaspórák alakja, helyeződése és a gombafonalak milyensége alapján (8.8b ábra). A rendkívül megbízható módszer (a hatékonysága meghaladja a 90%-ot) jelentősége elsősorban a hosszú tenyészedejű *Microsporium* és *Trichophyton* fajok okozta dermatophytosisok diagnosztikájában van, mivel a gyógykezelés már a mikroszkópos vizsgálatot követően megkezdhető (l. a 8.8b ábrát és 8.9. ábra).

A GOMBÁK TENYÉSZTÉSE ÉS MEGHATÁROZÁSA

Bevezető

A gombák okozta betegségek gyógykezeléséhez a patogén gombák meghatározása, azonosítása alapvető fontosságú, hiszen számos olyan gombafaj is szennyezheti a beteg állatból származó mintát, amelynek állategészségügyi szerepe nincs. A beteg állat klinikai, az elváltozást mutató területek Wood-lámpás és a hagyományos festékekkel, valamint KOH-os feltárással végzett mikroszkópos vizsgálatainak diagnosztikai értéke csekély. A calco-

fluor white-tal kezelt minták vizsgálata alapján már kimondhatjuk a gombás megbetegedés gyanúját, az adott gombafaj meghatározását azonban csak laboratóriumi táptalajokon végzett tenyésztést követően végezhetjük el. A gombafajok tenyésztést követő meghatározását élesztő- és penészgombákra készített határozókulcsok és szakkönyvek segítik. A gombák tenyésztéséhez vagy magunk készítünk táptalajokat, vagy a kereskedelmi forgalomban lévő kész táptalajokat használjuk. Hazánkban több cég kínálja a táptalaj készítéséhez szükséges összetevőket, a kész táptalajokat, az antifungális hatóanyagot tartalmazó korongokat, a gombameghatározó teszteket, valamint a szerológiai vizsgálatokra alkalmas gombaantigéneket.

ÉLESZTŐGOMBÁK

A Sabouraud-féle dextrózagár (SD) készítése:

- az alapagar összetétele: 13 g agar és 2500 ml desztillált víz;
- az alaplevés összetétele: 50 g pepton, 200 g glükóz és 2500 ml desztillált víz (pH = 5,6).

Az alapagar és az alaplevés 1:1 arányú elegyében (500–500 ml) a felhasználás előtt feloldunk 0,1 g klóramfenikolt a baktériumok szaporodásának gátlása céljából.

A laktófenol-gyapoptkék festék összetétele: 20,0 g fenolkristály, 40,0 ml glicerin, 20,0 ml ecetsav, 20,0 ml desztillált víz.

Az élesztőgombák tenyésztésére általában Sabouraud-féle glükózagart, maláta- és Yeast Morphology-agart alkalmazunk, de számos egyéb speciális táptalajra is szükség lehet. Az élesztőgombákat 37 °C-on 4–5 napig tenyésztjük.

A tenyészetben vizsgáljuk a telepek alakját, színét, fényét, állományát, felületének és szélének szerkezetét, majd mikroszkóppal a sejtek alakját és nagyságát. Vizsgáljuk továbbá a spóráképzést (malachitzöld-szafraaninfestés), a micélium- és pszeudomicélium-képzést (kukoricalisztagar), levestáptalajban a hártyaképzést, valamint az asszimilációs és fermentációs képességet számos cukorra vonatkozóan.

A szaklaboratóriumi vizsgálatokkal nyert morfológiai, tenyésztési, fermentációs és asszimilációs adatok ismeretében a gombákat gombahatározók alapján azonosítjuk.

Az azonosításra korszerűbb és gyorsabb módszer a kereskedelemben beszerezhető tesztek alkalmazása. A tesztmódszerrel végrehajtott asszimilációs vizsgálatokat követően a mellékelt határozókulcs alapján a gombák azonosíthatók.



Candida albicans. A *Candida* nemzetségnek mintegy 150 fajtát ismerjük, de az állatokban elsősorban a nyálkahártyákon és az emésztőtraktusban élő *Candida albicans* okoz megbetegedést. A *Candida* fajok által okozott leggya-

A vizsgálat menete

Mi kell hozzá?
Sterilfülke, hőlégtelítőt, autoklávok, inkubátorok, termosztát, mikroszkóp, táptalajok, tesztkészlet

Értékelés

koribb megbetegedéseket lásd az összefoglaló táblázatban (☞ 8.8. táblázat, 347. o.). A *Candida albicans* véresagaron és Sabouraud-féle táptalajon 24–48 óra alatt 37 °C-on tenyésztve fehér, fényes, jellegzetes élesztőszagú telepeket képez. Azonosítására vagy gyorstesztet alkalmazunk, vagy a cukrok asszimilálását és a chlamydospóra-képzést vizsgáljuk. A laboratóriumnak a *Candida albicans* meghatározásához 24–36 órára van szüksége.

Malassezia pachydermatis. Az unipolárisan sarjadzó élesztőgomba az állatok bőrén és külső hallójáratában fordul elő. Jellegzetes palack alakja miatt jelenléte mikroszkópos vizsgálattal is megállapítható. Élesztőkivonatot is tartalmazó Sabouraud-féle agaron 48–72 óra alatt 35 °C-on tenyésztve kissé matt, törtefehér, az agarról könnyen leemelhető telepeket képez.

Cryptococcus neoformans. A *Cryptococcus* nemzetség 19 fajából csak a *Cryptococcus neoformans* az, amelyik mind emberre, mind állatra patogén. A gomba elsősorban a talajban és madárürülékben fordul elő. Jól nő a baktériumok tenyésztésére alkalmazott véresagaron és Sabouraud-féle agaron, a tenyészideje azonban hosszú (37 °C-on 2 hét). A gomba igen széles mukopoliszacharid tokot képez, amely az állati szervezetben különösen kifejezett. A tokot tusfestéssel mutathatjuk ki. A gomba azonosítására és a diagnózis kimondására biokémiai teszt sorokat és egéroltást alkalmazunk.

FONALAS GOMBÁK

Dermatophytonok

Mikózisok gyanúja esetén a szőrdarabokat és hámpikkelyeket speciális gombatáptalajok felületére helyezzük. A dermatophytonok tenyésztésére általánosságban használhatjuk a Sabouraud-féle glükózagart (☞ 341. o.), de a specifikus Dermatophyton Test Medium (DTM-) táptalaj megfelelőbb (8.10. ábra). A DTM-

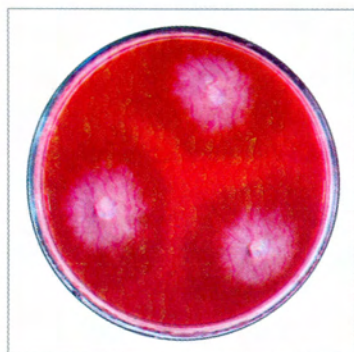
táptalaj a gyorsabban növekvő penészgombák növekedésének gátlására cikloheximidet (aktidiont), a baktériumok növekedésének gátlására antibiotikumot is tartalmaz.

A tenyésztést 26 °C-on végezzük, a tenyésztési idő több hét. Az inkubálási idő a gombafajoktól függően 1–6 hét(!) között változhat, *Microsporum canis* esetében általában 2–8 nap, egyes *Trichophyton* fajok esetében 2–6 hét.

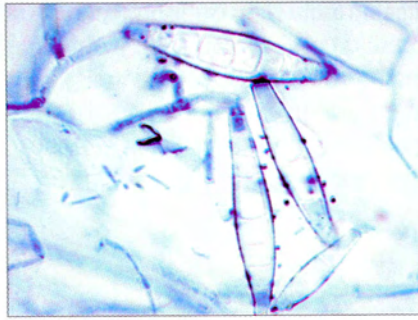
A patogén gombák azonosítása a morfológiai jellemzők meghatározásán alapul: a tenyészetből nyert izolátumokat makro-

szkóposan és mikroszkóposan vizsgáljuk, továbbá tárgyilemez-preparátumaikat elemezzük. A gombasejtek, a hypharészek és az ivartalan szaporítóképletek (pl. microconidiumok) mikromorfológiai vizsgálatokor *laktofenol-anilinkékkel*

8.10. ábra. *Microsporum canis* telepei Dermatophyton Test Medium (DTM-) táptalajon



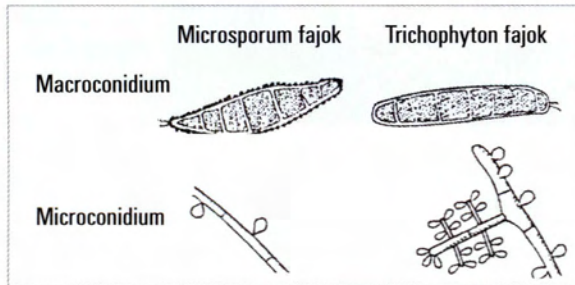
vagy metilénkéssel festett készítményeket használunk (8.11. ábra). Leggyakrabban tárgylemezre csöppentett vízben szuszpendáljuk a gombatelepből levett kis részletet, ami fedőlemezzel borítva azonnal vizsgálható. Hasonlóan gyors a celluluszalaggal készített teleplenyomat vizsgálata, amikor tárgylemezre csöppentett kontrasztfestéken buborékmentesen terítjük le a szalagot, és a tárgylemez széléin ragasztással rögzítjük. Az így készített preparátumok immerziós lencsével is vizsgálhatók.



8.11. ábra. *Microsporium canis* többrekeszes macroconidiumjai (metilénkéfestés)

☺ ☹ A *Microsporium* és a *Trichophyton* nemzetség – a táptalajon képzett ivartalan spóráik (macro- és microconidiumok) jellegzetes alakjai révén – elkülöníthető (8.12. ábra). A *Microsporium* fajok makrospórái (ivartalan szaporítóképlet, macroconidium) csónak alakúak, több rekesszel osztottak, a felületük szemecskézett, a metszetben kevés mikrospóra látható. A *Trichophyton* fajok makrospórái szivar alakúak, több rekeszűek, a felületük sima, a metszetben igen nagy mennyiségű microconidium látható. A hazánkban leggyakrabban előforduló *Dermatophyton* fajokat a 8.5. táblázatban foglaltuk össze.

Értékelés



8.12. ábra. *Microsporium* és a *Trichophyton* fajok macro- és microconidiumjai

Gombafaj	Előfordulás
<i>Microsporium canis</i>	Kutya, macska (ember)
<i>Microsporium gypseum</i>	Rágcsáló, ló, kutya
<i>Microsporium gallinae</i>	Csirke, pulyka
<i>Microsporium nanum</i>	Sertés
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Rágcsáló, kutya, ló
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Szarvasmarha, ritkán juh, ló, ember
<i>Trichophyton erinacei</i>	Európai sün, kutya
<i>Trichophyton equinum</i>	Ló, ritkán más állat, ember

8.5. táblázat. A *Dermatophyton* fajok előfordulása

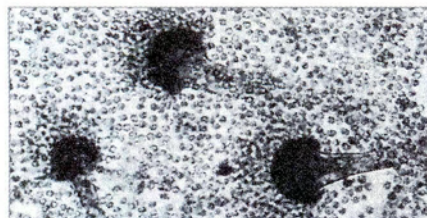
Hibaforrások. Nagyon fontos azt tudnunk, hogy a dermatophytonok makrospórákat csak laboratóriumi táptalajon képeznek. Mikroszkópos vizsgálattal csak a sok kicsi, kerek arthrospórájukat lehet látni. Sajnos a mikroszkópos metszetben előforduló nagyobb penészgombaspórákról (pl. Alternária) sokan gondolják, hogy az a *Microsporum canis* jellegzetes, csónak alakú macroconidiuma.

Penészgombák

Aspergillus fajok. Az *Aspergillus* nemzetségen belül több száz fajt ismerünk. Az állatok aspergillost 90–95%-ban az *Aspergillus fumigatus* okozza, míg az *Aspergillus flavus* elsősorban az állatok aflatoxikózisáért felelős.

Értékelés

☺ ☹ Az *Aspergillus* fajok a táptalajon gyorsan növekednek, hypháikat szep-
tumok tagolják. Tenyésztési idejük 37 °C-on Sabouraud-féle dextrózagaron
5 nap. Kisebb hőmérsékleten is jól
növekednek. Telepeik vattaszerűek,
bársonyosak és kékeszöld színűek.
A celluxszalagos lenyomatból készí-
tett preparátumok (pl. tojásbárta,
légszákdarabka, orrváladék, légzacs-
kóváladék, fülváladék stb.) vizsgálata
során az aspergillusok jól felismer-
hetők a spóratartó nyelen díszmák-
szerűen elrendeződött spóráik miatt (8.13. ábra).



8.13. ábra.
*Aspergillus fumiga-
tus* díszmák fejére
emlékeztető spórái

Az *Aspergillus fumigatus* okozta leggyakoribb megbetegedéseket a 8.6. táblázatban foglaltuk össze.

8.6. táblázat.
Az *Aspergillus fumi-
gatus* okozta leg-
gyakoribb megbete-
gedések állatokban

Állatfaj	Betegség
Ló	Nasalis granuloma, légzacsakómikózis, cornea fekély, csikók intestinalis aspergillost
Kutya	Otitis externa, krónikus rhinitis, trombózzal járó generalizált aspergillost
Szarvasmarha	Vetélés, pneumónia, mastitis, borjak intestinalis aspergillost
Baromfifélék, díszmadarak	Légszák-aspergillost, generalizált aspergillost

Zygomycost okozó penészgombák. Leggyakrabban a Mucorales rendbe tartozó *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* és *Mortierella* fajok okoznak megbete-
gedéseket (vetélés, pneumonia, gastrointestinalis fekélyek, ☹ 8.8. táblázat,
347. o.). Ezek a penészgombák gyorsan nőnek Sabouraud-féle táptalajon. Telep-
morfológia és ivartalan szaporítóképleteik alapján határozókönyvek segít-
ségével azonosíthatóak.

DIMORF GOMBÁK

Az élesztőformában (az állati szövetben és táptalajon 37 °C-on) és penészformában (a környezetben és táptalajon 25 °C-on) is előforduló dimorf gombák az állatok mellett az emberben is súlyos betegséget okoznak, ezért tenyésztésük körültekintő és speciális laboratóriumi körülményeket, különböző hőmérsékletű termosztátokat igényel.

☺ ☹ A dimorf gombák tenészideje 5 nap és 4 hét között változik. Azonosításukra morfológiai vizsgálatokat, antigéntesztet, immunológiai és szerológiai vizsgálatokat, valamint egéroltást vehetünk igénybe. Az értékelés speciális határozókulcsok segítségével a szaklaboratórium feladata.

Az Európában leggyakrabban előforduló dimorf gombák a 8.7. táblázatban láthatók.

Dimorf gomba	Gazdaszervezet	Rezervoár
<i>Sporothrix schenckii</i>	Kutya, macska, ember, ló	Talaj, farészek
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Kutya, ember	Savas talaj
<i>Histoplasma capsulatum</i> (sporadikus)	Kutya, macska, ember	Madár és denevér bélsár
<i>Histoplasma farciminosum</i>	Ló	Nem ismert

Értékelés

8.7. táblázat.
Az Európában előforduló dimorf gombák

A GOMBAELLENES HATÓANYAGOK IRÁNTI ÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATA

A különféle gombák antimikotikus szerek iránti érzékenysége jelentősen eltérhet. Napjainkban – amikor már nagyszámú antifungális hatóanyag gyakorlati alkalmazására van lehetőség – a gyógykezelés hatékonyságát a kórokozók gyógyszerérzékenységi vizsgálatával segíthetjük elő.

A gombás betegségek hatékonyabb gyógykezelését célzó fejlesztések eredményeként a modern antimikotikus terápia a széles hatásspektrumú szerek helyett az egyes gombafajokra specifikusabban ható és kisebb mellékhatásokkal járó készítményeket részesíti előnyben. Ebből adódóan a célzott laboratóriumi vizsgálatok elvégzése a hatékony gyógykezelés egyre fontosabb eszköze.

A baktériumérzékenységi vizsgálatokhoz hasonlóan agardiffúziós módszert alkalmazunk (☞ 303. o.), amelyet standardizált, speciális táptalajon (gombák esetében a Tripkazin) kell elvégezni, mert közönséges gombatáptalajokon az érzékenység kellő biztonsággal nem állapítható meg. A táptalaj felületén szétszórva gombaszuszpenzióra a megfelelő hatóanyaggal átitatott ko-

Bevezető

A vizsgálat menete

Mi kell hozzá?
Sterilfülke, 37 °C-os és 25 °C-os termosztát, speciális táptalajok, antimikotikus korongok

rongokat helyezzük, a lemezeket megfelelő hőmérsékleten termosztátban inkubáljuk (az élesztőgombákat 37 °C-on 24–48 óráig, a dermatophytonokat 25 °C-on 1–3 hétig, a dimorf gombákat mindkét hőmérsékleten 1–4 hétig, a penészgombákat 25 °C-on 1 hétig).

Hazánkban több cég forgalmaz antimikotikum-érzékenységi vizsgálatra alkalmas korongokat, amelyek leggyakrabban a következő antimikotikumokat tartalmazzák: amfotericin B, klotrimazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol, 5-fluorocitozin, nisztatin és grizeofulvin.

Értékelés ☺ ☹ A gomba érzékenységét a korongok körül kialakult gátlózóna méretéből állapítjuk meg. A gátlózóna nagyságát nemzetközileg elfogadott standard-táblázatok adják meg, a vizsgálatot ezek alapján értékeljük (érzékenység, rezisztencia).

GOMBAIMMUNOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Bevezető Az immunológiai vizsgálatok elvégzésére elsősorban humánlaboratóriumi diagnosztikumokat alkalmazhatunk. Specifikusságuk azonban az állatorvosi mikológiai diagnosztikában való alkalmazásukat nem minden esetben teszi lehetővé.

A leggyakoribb mikózisok kimutatására használatos immunológiai módszerek a következők:

- a poliszacharid típusú oldható gombaantigének (Candida, Aspergillus, Cryptococcus) kimutatása latexagglutinációs gyorsesztekkel,
- az Aspergillus- és a Candida-fertőzöttség igazolása immunprecipitációs vizsgálatokkal (standardantigének és kontrollsavók állnak rendelkezésre),
- az Aspergillus elleni ellenanyagok kimutatása az Ouchterlony-féle teszttel, indirekt hemagglutinációs vizsgálatokkal és latexagglutinációs teszttel, valamint az utóbbi években kifejlesztett counterimmuno-elektrophoresissel és ELISA-módszerekkel,
- a dimorf gombák (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*) okozta fertőzöttség kimutatása komplementfixációs és immundiffúziós tesztekkel.

A vizsgálat menete A gombás betegségekkel kapcsolatos immunológiai vizsgálatok kivitelezése hasonló azokhoz, amelyeket más kórokozók előidézte bántalmakkal kapcsolatán ismertettünk (☛ IMMUNDIAGNOSZTIKA, 315. o.).

Értékelés ☺ ☹ A gombaimmunológiai vizsgálatok értékeléséhez az alkalmazott gyári készlet leírásai nyújtanak útmutatást (☛ még IMMUNDIAGNOSZTIKA, 318. o.).

AZ ÁLLATOK LEGGYAKORIBB MIKÓZISAINAK ÖSSZEFOGLALÁSA

8.8. táblázat.
Az állatok leggyakoribb mikózisainak összefoglalása

Állatfaj	Mikózis	A kórokozó gombafajok
Szarvasmarha, juh, kecske	Dermatophytosis (ringworm)	<i>Trichophyton verrucosum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporum canis</i> (ritkán)
	Mastitis	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Trichosporon</i> fajok
	Abortus, vaginitis	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Candida</i> fajok
	Pseudomikózis	Baktériumok: <i>Dermatophilus congolensis</i> , <i>Actinomyces bovis</i>
Ló	Dermatophytosis (ringworm)	<i>Trichophyton equinum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton verrucosum</i> , <i>Microsporum equinum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i>
	Genitáliák, húgyúti és légzőszervi megbetegedések	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i>
	Tüdő és légzacskó, abortus	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , társul: <i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i>
	Keratitis	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Candida</i> fajok
	Cryptococcosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Epizoociás lymphangitis	<i>Histoplasma farciminosum</i>
	Pseudomikózis	Baktérium: <i>Dermatophilus congolensis</i>
Sertés	Dermatophytosis	<i>Microsporum nanum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	Emésztőszervek	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida slooffii</i> , <i>Candida krusei</i>
	Pseudomikózis	Baktérium: <i>Actinomyces bovis</i>
Kutya, macska	Dermatophytosis	<i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	Candidiasis (nyálkahártya, bőr, emésztőszervek)	<i>Candida albicans</i>
	Malasseziózis (bőr, hallójárat, genitáliák)	<i>Malassezia pachydermatis</i>
	Cryptococcosis (idegrendszer, légzőszervek)	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Sporotrichosis (szubkután)	<i>Sporothrix schenckii</i>
	Histoplasmosis (légzőszervek, generalizált)	<i>Histoplasma capsulatum</i>

Állatfaj	Mikózis	A kórokozó gombafajok
Kutya, macska	Észak-amerikai blastomycosis (légzőszervek, generalizált)	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	Nasalis mikózis	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus</i>
	Pseudomikózis	Baktérium: <i>Nocardia asteroides, Actinomyces bovis</i>
Baromfifélék, madarak	Favus (ringworm)	<i>Microsporium gallinae</i>
	Aspergillosis (légzőszervek, tojás)	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus</i>
	Candidiasis (emésztőszerv, nyálkahártya, bőr)	<i>Candida albicans, Candida krusei, Candida tropicalis</i>
	Cryptococcosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Rágcsálók, prémes állatok	Dermatophytosis (ringworm)	<i>Trichophyton mentagrophytes, Microsporium canis</i>
	Malasseziosis (bőr)	<i>Malassezia pachydermatis</i>
	Candidiasis (emésztőszervek)	<i>Candida</i> fajok
	Aspergillosis (légzőszervek)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Halak	Saprolegniosis (bőr, ikra, szisztémás)	<i>Saprolegnia ferax</i>
	Branchiomycosis (kopoltyú)	<i>Branchiomyces</i> fajok
	Ichthyophoniosis (szisztémás)	<i>Ichthyophonus</i> fajok