

# Módosított oxidáz-próba

S Z I T A G É Z A

Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszerhigiéniai Tanszék

Érkezett: 1984. október 9.

A mikrobiológiai diagnosztikában az oxidáz-próbát a Gram-negatív baktériumok identifikálásánál alkalmazzuk. A Gram-negatív baktériumok többsége ugyanis – az Enterobacteriaceae, a Xantomonas, az Acinetobacter és még néhány genusz kivételével – citokrómoxidáz enzimaktivitással rendelkezik (2). A mindennapi gyakorlati munkában az oxidáz pozitívitas fontos biokémiai reakció a Pseudomonas, Aeromonas, Plesiomonas, Brucella, Bordetella és Pasteurella nemzetségbe tartozó baktériumok azonosításakor. Továbbá az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatánál rutin laboratóriumokban gyakran alkalmazzák az egész Enterobacteriaceae-család, mint fekély indikátor kimutatását a gyártáshigiéné és gyártástechnológia ellenőrzésére. E vizsgálatnál a kitenyészített mikrobák azonosítási, megerősítő próbájaként a  $\text{NO}_3$  redukción és glukóz fermentáción kívül az oxidáz negatívitás szerepel, mely nagyszámú próba elvégzését igényli.

Maguk a citokrómok olyan enzimek, amelyek a sejtek terminális oxidációjában mint elektronátvivők játszanak fontos szerepet. A sejt oxidáció során a felvett tápanyagok bontási termékei főleg dehidrogénezéssel oxidálódnak, miközben  $\text{NADH}_2$  és  $\text{NADPH}_2$ , valamint redukált flavin keletkezik. Mivel a molekuláris oxigén felhasználása a szubsztrátoktól el van választva, az oxidációs folyamat nem közvetlen. A sejt légzés kutatásánál Warburg (3) fedezte fel az oxigént aktiváló – abból elektront átvevő – enzimet, a citokrómoxidázt, vagy más néven légzőfermentet. Ezután Szent-Györgyi (3) mutatott rá arra, hogy az intermedier anyagcserében a dehidrogénezés és az oxigénaktiválás egymással párhuzamosan végbemenő, összekapcsolt folyamat. Ezzel nagyjából egy időben Kielin (3) fedezte fel a szövetekben spektroszkópos módszerrel kimutatható citokrómokat. Ezek a fermentumok kémiaiilag hemet tartalmaznak és az oxidáció során a dehidrogenáz enzimek és a légzőferment közötti oxido-redukációs folyamatokat katalizálják.

A citokrómokat a légzőferment reoxidálja, ezért nevezik a Warburg-féle légzőfermentumot citokrómoxidáznak. A citokróm enzimek nem egységesek. A, B, C típusú különböztetnek meg, melyek közül az A csoport egyik tagja, az ún.  $\text{A}_3$ , a citokrómoxidázzal azonos.

Az intermedier anyagcserében nem minden oxidáció megy végbe a fentiekben vázolt alapelvek szerint, bár kétségtelenül ez a legfontosabb mechanizmus. Így a mikroorganizmusok anyagcseréjében az oxidáció típusban egymástól eltérő úton valósulhat meg. Ennek megfelelően több baktériumfaj rendelkezik citokrómoxidáz enzimmel, másokban viszont nem található meg. Mivel a cianidok a citokrómoxidázt bénítják, ezért az utóbbiak – melyekből a légzőferment hiányzik – nem is gátlhatók ilyen vegyületekkel.

A citokrómoxidáz enzimmel rendelkező baktériumok általában obligát aerobok. Ide tartoznak a már említettek közül a Pseudomonas genusz tagjai is, bár ezek nitrátok jelenlétében alacsony oxigéntenzíó mellett is növekedhetnek.

A bakteriológiai diagnosztikai gyakorlatban alkalmazott oxidáz-próba a citokrómoxidáz enzim kimutatását szolgálja, mely oxigén jelenlétében egyes redox indikátorok színváltozását okozza. Redox indikátorként általában különféle aminosavvegyületek vizes oldatait használják. A próba elvégzését, illetve a reagens összetételét a mikrobiológiai szabványok (4) pontosan előírják.

A próba kivitelezése történhet a kérdéses telep szűrőpapírra kenésével, majd reagens ráceppentésével; vagy a vizsgálandó törzs 24 órás zselatinos agartenyészetének reagenssel való leöntésével.

Megjegyzés: a vas-ionok már nyomokban is katalizálják a reakciót, ezért véres agarról készítve nem megbízható. A vizsgálandó telepet célszerű üvegbot, vagy platina kacs segítségével levenni.

Az MSZ 3640/10–82 „Enterobaktériumok kimutatása és meghatározása” szabvány háromféle oxidáz-reagens használatát írja le:

#### *Oxidáz-reagens I.*

N,N,N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> -tetrametil-parafeniléndiamin-hidroklorid	0,05 g
desztillált víz	5 cm <sup>3</sup>

#### *Oxidáz-reagens II.*

A-oldat	
alfa-naftol	1,0 g
etilalkohol 96 tf%	100 cm <sup>3</sup>
B-oldat	
para-amino-dimetilamin-hidroklorid	1,0 g
desztillált víz	100 cm <sup>3</sup>

Összeállítás:

közvetlenül felhasználás előtt az A és a B oldatokból egyenlő mennyiséget összekeverünk.

#### *Oxidáz-reagens III.*

dietil-parafeniléndiamin-hidroklorid	1,0 g
desztillált víz	100 cm <sup>3</sup>

Az Országos Közegészségügyi Intézet (2) és más szakkönyvek (3) dietil-parafeniléndiamin-hidroklorid, vagy parafeniléndiamin-hidroklorid frissen készített 1%-os vizes oldatának használatát írják elő.

A felsorolt összetételű oxidáz-reagensok használata során egyik probléma az, hogy csak frissen elkészítve alkalmasak vizsgálatra, mivel oldatban könnyen oxidálódnak és így elszíneződve a velük végzett reakció nem értékelhető. Mivel a pozitív próba színváltozása nem nagyon feltűnő, a téves diagnózis elkerülésére mindig kell egy biztosan negatív kontrollt is beállítani, ami az *Escherichia coli* 35034 számú törzse (2), és egy pozitív kontrollt, ami *Pseudomonas aeruginosa*. Munkánk során azt akartuk kiküszöbölni, hogy a reagenst mindig frissen kelljen készíteni, ezért megpróbáltuk tartósítani. Célkitűzésünk volt, hogy a parafeniléndiamin-hidroklorid mellé olyan szert találjunk, amely lehetővé teszi hosszú ideig való tárolhatóságát anélkül, hogy gyengítene a reakció színét, de ugyanakkor nem színeződik meg a negatív reakció sem.

Több vegyszerrel való próbálkozás után erre a célra a legmegfelelőbbnek az L-aszkorbinsavat találtuk.

*A stabilizált reagens összetétele a következő:*

parafeniléndiamin-hidroklorid	1 g
L-aszkorbinsav	0,1 g
desztillált víz	100 cm <sup>3</sup>

Fontos, hogy először a parafeniléndiamin-hidrokloridot kell a vízben feloldani, majd oldódás után szűrni. Az aszkorbinsavat csak szűrés után célszerű hozzáadni.

Az így elkészített reagens világos sárga színű és légmentesen lezárt üvegben hűtőszekrényben és szobahőmérsékleten egyaránt legalább három hónapig tárolható.

A C-vitaminnal készült reagens nem gyengíti a pozitív oxidáz reakció kialakulását, sőt kifejezetten felerősíti azt annyira, hogy megkérdőjelezi a kontrollok beállítását.

### Következtetések

A módosított oxidáz reagens használatának munkánk során a következő előnyeit tapasztalhattuk:

1. Hosszú ideig tárolható, így nem kell állandóan friss oldatot készíteni.
2. A pozitív reakció könnyebben, egyértelműbben elbírálható.
3. Nem kell negatív kontrollt beállítani.
4. Jelentős a vegyszertakarékosság.
5. Mivel a felesleges vegyszer nem kell naponta kiönteni, kisebb a környezet szennyeződés.

### I R O D A L O M

- (1) Kiss J. (szerk.): Mikrobiológiai vizsgálati módszerek az élelmiszeriparban. 2. Minőségi vizsgálatok. Mezőgazdasági Kiadó Budapest, 1978.
- (2) Lányi B. (szerk.): Járványügyi és klinikai bakteriológia. Módszertani útmutató. Országos Közegészségügyi Intézet Budapest, 1980.
- (3) Straub F. B.: Biokémia. Medicina Könyvkiadó Budapest, 1965.
- (4) MSZ 3640/10-82 Húsok és húsalapú élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata. Enterobaktériumok kimutatása és számának meghatározása.

### МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПРОБА НА ОКСИДАЗУ

*G. Cuma*

Автор выявлял имеющийся в некоторых бактериях цитохромоксидазный фермент, применяя для этого редокс-индикатор.

Цитохромоксидазный фермент играет роль переносчика электронов, в так называемом, терминальном окислении на последней стадии интермедерного обмена веществ клеток.

Его выявление является важным для диагностики.

В действующих в настоящее время стандартах и технической литературе в качестве реагента рекомендуется применение 1%-го водного раствора парафенилендиамина или сходного с ним соединения.

Оценка пробы проведенной по этому методу требует соответствующего опыта. Раствор реагента для проведения пробы следует готовить ежедневно.

Для устранения ошибок автору удалось решить вопрос консервирования оксидантного реагента и также удалось сделать полностью однозначной оценку пробы.

Новый метод позволяет экономии химикатов и снижает степень загрязнения окружающей среды.

## MODIFIED OXIDASE-TEST

*G. Szita*

Cytochromoxidase enzyme present in some bacteria can be detected with oxidase-test using redox indicator. Cytochromoxidase enzyme plays the role of the electron-transfer in the last period of the intermediary metabolism of cells, in the so-called terminal oxidation. Its detection is very important from diagnostic point of view.

The valid standards and the technical books prescribe the usage of the solution of 1% p-phenylenediamine – or similar compounds – in water. The judgement of the test performed this way needs practice and the reagent must be freshly prepared every day. To eliminate the errors the author succeeded in preserving the oxydes-reagent and by this procedure the judgement of the test became totally unambiguous. The new method saves chemical and reduces the environmental pollution as well.

## EINE MODIFIZIERTE OXYDASEPROBE

*G. Szita*

Das in gewissen Bakterien gegenwärtiges Zytochromoxydase – Enzym wird mittels der Oxydaseprobe bei Anwendung eines Redoxindikators nachgewiesen. Das Enzym Zytochromoxydase spielt in der letzten Periode des intermediären Stoffwechsels der Zellen, bei der sogenannten terminalen Oxydation als Überträger eine Rolle, sein Nachweis ist von diagnostischer Hinsicht sehr wichtig.

Die gegenwärtig gültigen Normen bzw. Fachbücher schreiben die Anwendung einer 1% igen wässrigen Lösung von Paraphenyldiamin – oder von verwandten Verbindungen – als Reagenzien vor. Die Beurteilung einer Probe mit dieser Methode beansprucht jedoch eine gewisse Übung, und das Reagens muss täglich frisch bereitet werden.

Um die Fehler zu eliminieren, musste auch das Problem der Konservierung des Oxydasereagens gelöst werden. Dadurch wurde auch das Problem der Beurteilung der Probe eindeutig gelöst. Die neue Methode verlangt wenige Chemikalien und vermindert auch die Verunreinigung der Umgebung.

## L'ESSAI D'OXYDASE MODIFIÉ

*G. Szita*

Avec de l'essai d'oxydase on décèle employant un redoxyindicateur l'enzyme cytochromoxydase de quelque bactérie. L'enzyme cytochromoxydase joue un rôle important dans la dernière phase du métabolisme intermédiaire des cellules, c'est-à-dire l'oxydation terminale, comme un transmetteur d'électrones, sa détection est importante diagnosticalement. Les normes valides actuellement et les livres spéciaux ordonnent l'emploi d'une solution aqueuse à 1% de p-phenilène diamine ou des composés de la même nature comme un réactif.

L'évaluation de l'essai réalisée avec cette méthode demande beaucoup de pratique; le réactif doit être préparé de frais chaque jour.

Pour éliminer les erreurs il a réussi à donner la solution de la conservation du réactif oxydase et l'évaluation de l'essai est en outre devenue concordante. On emploie peu de réactifs et on cause moins de pollution avec cette méthode nouvelle.